

SÉRIE A, N° 3833.

N° D'ORDRE :

4684

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Monique PECOT-DECHAVASSINE

1^{re} THÈSE. — Etude biochimique, pharmacologique et histochimique des cholinestérases des muscles striés chez les Poissons, les Batraciens et les Mammifères.

2^e THÈSE. — Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 14 mai 1962 devant la Commission d'examen.

MM. PRENANT, *Président.*

MONNIER, }
COUTEAUX, } *Examineurs.*

MASSON ET C^{ie}, ÉDITEURS
LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
120, Boulevard Saint-Germain, PARIS (VI^e)

1962

SÉRIE A, N° 3833.

N° D'ORDRE :

4684

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Monique PECOT-DECHAVASSINE

1^{re} THÈSE. — Etude biochimique, pharmacologique et histochimique des cholinestérases des muscles striés chez les Poissons, les Batraciens et les Mammifères.

2^e THÈSE. — Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 14 mai 1962 devant la Commission d'examen.

MM. PRENANT, *Président.*

MONNIER, }
COUTEAUX, } *Examineurs.*

MASSON ET C^{ie}, ÉDITEURS
LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
120, Boulevard Saint-Germain, PARIS (VI^e)

1962

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

Doyen M. ZAMANSKY.

PROFESSEURS

G. JULIA	T Analyse supérieure et Algèbre supérieure.	TRILLAT	T Microscopie et diffraction électronique.
De BROGLIE	T Théories physiques.	WIEMANN	T Chimie org. et structur.
PRENANT	T Anat. et Histol. comp.	JACQUINOT	T Spectroscopie et physique céleste (Orsay).
PÈRES	T Mécan. des fluides et appl.	VASSY	T Physique de l'atmosph.
GRASSÉ	T Evol. des êtres organisés.	DESTOUCHES	T Théories physiques.
PRÉVOST	T Chimie organique.	AMIEL	T Chimie générale.
CHAUDRON	T Chimie appliquée.	HOCART	T Minéral. et cristallogr.
WYART	T Minéralogie et cristallogr.	J.-P. MATHIEU	T Physique (Optique).
TEISSIER	T Zoologie.	COUTEAUX	T Biologie animale (P.C.B.).
MANGENOT	T Biologie végétale (Orsay).	MAY	T Zoologie (Orsay).
P. AUGER	T Physique quant. et relat.	CHOQUET	T Théor. des fonctions et topologie.
MONNIER	T Physiologie générale.	FELDMANN	T Biologie végétale marine.
PIVETEAU	T Paléontologie.	GUINIER	T Phys. des solides (Orsay).
ROCARD	T Physique (E. N. S.).	JOST	T Physiologie comparée.
H. CARTAN	T Mathématiques (E. N. S.).	FORTET	T Calcul des probabilités et physique mathémat.
LAFFITTE	T Chimie générale.	SCHWARTZ	T Calc. diff. et intégr.
FAVARD	T Géométrie supérieure.	CHOUARD	T Physiologie végétale.
COULOMB	T Physique du Globe.	MALAVARD	T Aviation (Techn. aéronautique).
M ^{lle} COUSIN	T Biol. anim. (S. P. C. N.).	BRELOT	T Calcul différ. et intégral.
CHRÉTIEN	T Chimie minérale.	NORMAND	T Synthèse organ. génér.
P. DRACH	T Zoologie.	BENARD	T Chimie minérale.
KASTLER	T Physique (E. N. S.).	BUVAT	T Botanique (E. N. S.).
EPHRUSSI	T Génétique.	DUGUÉ	T Statistiques mathémat.
RIVIÈRE	T Géol. (S.P.C.N.) et sédim.	SOULAIRAC	T Psychophysiologie.
GAUTHERET	T Biologie végétale (P.C.B.).	ULRICH	T Physiologie végétale.
LUCAS	T Recherches physiques.	MARÉCHAL	T Optique théor. et appl.
A. THOMAS	T Biologie cellulaire.	KIRRMANN	T Théories chimiques.
ARNULF	T Optique appliquée.	CHADEFAUD	T Botanique.
M. MORAND	T Enseig. de physique.	M ^{lle} LE BRETON	T Physiol. de la nutrition.
SOLEILLET	T Physique (P. C. B.).	SALEM	T Mathématiques générales.
FORTIER	T Mécan. expér. des fluides.	LELONG	T Application de l'analyse à la Géométrie.
DANJON	T Astronomie.	DEVILLERS	T Anat. et histol. comp.
PETIT	T Biologie maritime.	EHRESMANN	T Topologie algébrique.
QUENEY	T Météorologie et dynamique atmosphérique.	FRANÇON	T Physique (S. P. C. N.).
GALLIEN	T Embryologie.	GLANGEAUD	T Géogr. phys. et géol. dyn.
EICHORN	T Botanique.	GODEMENT	T Mathématiques (M. G. P.).
De CUGNAC	T Biol. végét. (S. P. C. N.).	PISOT	T Techniques mathémat. de la Physique.
M ^{lle} CAUCHOIS	T Chimie physique.	E. ROCH	T Géologie.
THELLIER	T Physique du Globe.	SCHATZMANN	T Astrophysique.
L'HÉRITIER	T Biol. génér. (Orsay).	TERMIER	T Paléontol. stratigraph.
GRIVET	T Radio-Elect. (Orsay).	ZAMANSKY	T Mathémat. générales.
PONCIN	T Mécanique générale.	LENNUIER	T Mathématiques (M. P. C.).
DUBREIL	T Arithmétique et théorie des nombres.	RIZET	T Génétique.
QUELET	T Chimie organique.	ROUTHIER	T Géologie appliquée.
CAIGNARD	T Géophysique appliquée.	M ^{me} TONNELAT	T Physique théorique.
CHAMPETIER	T Chimie macromolécül.		
CUVILLIER	T Micropaléontologie.		
JUNG	T Pétrographie.		



Professeurs (suite).

DIXMIER	T Mathématiques (M. P. C.).	M ^{lle} QUINTIN	T Electrochimie.
SOUCHAY	T Chimie générale.	MONOD	T Chimie du métabolisme.
AIGRAIN	T Electrotechn. génér.	BENOIT	T Physiol. anim. (Orsay).
BRUSSET	T Chimie systématique.	DE POSSEL	T Analyse numérique.
M. LÉVY	T Physique théorique des hautes éner. (Orsay).	CHARLOT	T Chimie analytique.
M ^{me} CHAIX	T Chimie biologique.	HAISSINSKY	T Radiochimie.
M ^{me} HUREL-PY ..	Biol. végétale (P. C. B.).	LÉMÉE	T Physiologie végétale (B. M. P. V.), (Orsay).
PIAUX	T Chimie (M. P. C.).	GUÉRIN	T Chimie (M. P. C.), (Orsay).
BRUN	T Mécan. théor. des fluides.	M. CHATELET	Chimie (P. C. B.).
LEDERER	T Chimie biologique.	JEAN	T Phys. nucl. (Orsay).
M ^{me} DUBREIL	T Mathém. (Agrégation).	MATTLER	T Phys. (S. P. C. N.), (Orsay).
M ^{me} LELONG	T Mathématiques (E. N. S.).	Louis MICHEL	Physique théorique des hautes éner. (Orsay).
BELLAIR	T Géologie (S. P. C. N.).	BERGERARD	Zoologie (Orsay).
COTTE	T Physique électricité.	BERTIN	Electronique (Orsay).
J.-E. DUBOIS	T Chimie organique.	BOUSSIÈRES	Chimie des radio-éléments. (Orsay).
LAMOTTE	T Zoologie (E. N. S.).	M ^{me} COUTURE	Thermodynam. et Mécan. physique.
A. MICHEL	T Chimie minér. (Orsay).	ELLENBERGER	Géol. appl. sur le terrain.
OLMER	T Energétique générale.	FRANC	Biol. animale (P. C. B.).
ROUAULT	T Electricité (Orsay).	SCHNELL	Botanique trop. (Orsay).
GAUTHIER	T Mécanique appliquée.	STOLKOWSKI	Physiologie générale.
BARCHWITZ	T Chimie physique.	ACHER	Chimie biol. (Orsay).
BROSSEL	T Physique atomique.	BAUDOIN	Biol. anim. (P. C. B.).
BUSER	Physiologie comparée.	BEAUMONT	Biol. anim. (S. P. C. N.).
CAMUS	Physiol. vég. (B. M. P. V.).	BLAMONT	Géophys., Ionosphère.
CASTAING	T Physique Orsay.	BOURREAU	Botanique.
CURIEN	T Minéral. et cristallogr.	D. CURIE	Physique (M. G. P.).
MOYSE	T Physiol. végét. (Orsay).	DURAND-DELGA ..	Géologie.
NOIROT	T Evolut. des êtres organ.	FRÉON	T Chimie organ. (Orsay).
PANNETIER	Chimie génér. (Orsay).	HELLER	Physiologie végétale.
POSSOMPÈS	T Zoologie.	TORTRAT	Calcul des probabilités.
PULLMANN	T Chimie théorique.	CAILLEUX	Géologie (S. P. C. N.).
TEILLAC	T Physique nucl. et radio-activité.	MAGNAN	T Physique (S. P. C. N.).
TONNELAT	T Biol. physico-chimique.	DAUDEL	T Mécan. ondul. appl. à la chimie théor. et à la phys. nucl.
VILLE	T Econométrie.	M ^{lle} FOURCROY ..	Biol. végét. (S. P. C. N.).
WILLEMART	Chimie (P. C. B.).	M ^{me} CHOQUET- BRUHAT	T Mécan. analyt. et mécan. céleste.
DODÉ	T Chimie (Orsay).	M ^{lle} VEIL	T Physiologie générale.
FREYMAN	T Recherches physiques.	LWOFF	T Microbiologie.
GUINOCHE	T Biol. vég. (S. P. C. N.) (Orsay).	SIESTRUNK	T Mécan. phys. et expérim.
ROLLET	T Chimie (P. C. B.).	LACOMBE	T Métallur. des mét. nucl.
M ^{lle} JOSIEN	T Chimie (S. P. C. N.).	BROCHARD	T Phys. (P. C. B.) (Orsay).
CHEVALLEY	T Géomér. algèbr. et théor. des groupes.	CABANNES	T Mécanique générale.
ARNOULT	T Electronique (Orsay).	LESIEUR	T Math. (M. P. C.) (Orsay).
CHAPELLE	T Physique (Orsay).	MAZET	T Mécan. génér. (Orsay).
DELANGE	T Mathématiques (Orsay).	CAIRE	Géographie phys. et géol. dynamique.
DENY	T Mathémat. génér. (Orsay).	COMOLET	T Mécanique des fluides.
GERMAIN	T Mécan. théor. des fluides.	CORABEUF	Physiologie animale.
G. LUCAS	T Géologie.	DELOUE	Physique de l'exosphère.
ALLARD	T Chimie physique.	GORENFIOT	Botanique II (Orsay).
BERTHELOT	T Phys. fondamentale des hautes énergies (Orsay).	HOULLON	Biologie anim. (P. C. B.).
BRICART	T Météorol. et physique de l'atmosphère.	JULLIEN J.	Chimie (P. C. B.).
M ^{me} ALBE-FESSARD	Psychophysiol.	MALGRANGE	Techn. math. de la phys.
FRIEDEL	Phys. des solides (Orsay).	OLIVIER	Anthropologie.
M. JULIA	Etude des Moléculaires naturelles complexes.	NOZERAN	T Botanique II (Orsay).
LENDER	T Biol. animale (S. P. C. N.) (Orsay).	BLANC-LAPIERRE	Phys. (E. N. S.) (Orsay).
MAGAT	Physico-chim. des radio-éléments.		

Secrétaire général R. POUILLAIN.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548802_0022

A Monsieur PRENANT

Professeur à la Faculté des Sciences.

A Monsieur MONNIER

Professeur à la Faculté des Sciences.

A Monsieur COUTEAUX

Professeur à la Faculté des Sciences.

Ce travail a été effectué pour la plus grande part dans le Service de Chimie Thérapeutique A de l'Institut Pasteur.

L'accueil bienveillant que j'y ai reçu de M^{me} TH. TREFOUEL m'a donné la possibilité d'entreprendre ces recherches. Je tiens à lui exprimer ma vive reconnaissance.

Je dois remercier tout particulièrement M. le Docteur J. JACOB qui a bien voulu diriger mes recherches et qui, par son aide et ses précieux conseils, m'a permis de mener à bien le présent travail.

Qu'il me soit permis également de remercier vivement le Professeur COUTEAUX pour l'accueil si sympathique qu'il m'a réservé dans son Laboratoire et pour la constante attention qu'il a manifestée pour mes recherches.

ÉTUDE BIOCHIMIQUE, PHARMACOLOGIQUE ET HISTOCHIMIQUE DES CHOLINESTÉRASES DES MUSCLES STRIÉS CHEZ LES POISSONS, LES BATRACIENS ET LES MAMMIFÈRES

Par MONIQUE PECOT-DECHAVASSINE (1)

(Laboratoire de Pharmacologie de l'Institut Pasteur,
Laboratoire de Biologie Animale, P. C. B., Faculté des Sciences, Paris.)

SOMMAIRE

I. Introduction et historique	343
II. — Matériel et techniques	348
III. — Muscle droit abdominal (<i>rectus</i>) de Grenouille	351
A. Etude biochimique	352
1° Hydrolyse enzymatique des esters de la choline et de la thio- choline	353
2° Effets des inhibiteurs de cholinestérases	355
Discussion	358
B. Etude pharmacologique	361
1° Comparaison de l'activité contracturante des esters de la choline et de l'amyltriméthylammonium	364
2° Effets des anticholinestérasiques	367
— Potentialisations par la Néostigmine, le D. F. P. et le 3318 CT	367
— Essais d'association de deux anticholinestérasiques	371
Discussion	373

(1) Adresse actuelle : Laboratoire de Pharmacologie de l'Institut Pasteur.

c. Localisation des cholinestérases dans le rectus de Grenouille	380
1° Etude de la répartition par la méthode biochimique	381
2° Localisation par la méthode histochimique	384
Discussion des résultats histochimiques	391
Comparaison des résultats obtenus avec les méthodes biochimique et histochimique	393
d. Conclusion	396
IV. Muscles et organes de poissons électriques	396
A. Muscle latéral du Poisson-chat	398
1° Réponses des muscles superficiel et profond à des agents dépo- larisants	399
2° Etude du système cholinestérasique du muscle latéral du Poisson-chat	404
Etude biochimique	404
Etude pharmacologique	405
Localisation histochimique	408
Discussion	410
B. Organes électriques	413
1° Activité cholinestérasique	414
2° Inhibition par les anticholinestérasiques	414
3° Localisation de l'activité cholinestérasique	415
c. Discussion	416
V. — Muscles de mammifères	417
A. Etude biochimique de muscles du Rat, du Cobaye, du Chat et du Lapin	419
B. Localisation des cholinestérases	420
Par la méthode biochimique dans le diaphragme du Cobaye et du Rat	420
Par la méthode histochimique : Dans le diaphragme du Cobaye et du Rat	420
Dans différents muscles du Singe cynocéphale	421
c. Discussion	421
VI. — Conclusions générales	422
Résumé	429

I. — INTRODUCTION ET HISTORIQUE

C'est en 1926, avec les travaux de LOEWI et NAVRATIL sur le cœur, que le rôle de la cholinestérase fut mis en évidence pour la première fois.

Par la suite, DALE et FELDBERG (1934), BROWN, DALE et FELDBERG (1936) attribuèrent à l'acétylcholine un rôle dans la transmission de l'influx du nerf moteur au muscle strié; ce rôle apparaissait comparable à celui que cette substance joue dans la transmission de l'excitation vagale au niveau du cœur (LOEWI, 1921 et 1924). Il était indispensable cependant, pour que l'hypothèse de DALE et FELDBERG soit valable, que la destruction de l'acétylcholine survienne pendant la courte période réfractaire du muscle. L'intervention de la cholinestérase dans l'inactivation de l'acétylcholine parut d'autant plus vraisemblable que PLATTNER et HINTNER (1930) avaient montré la présence de cet enzyme dans le muscle.

Les premières recherches sur l'activité cholinestérasique du muscle strié révélèrent cependant que la concentration moyenne en enzyme est beaucoup trop basse pour hydrolyser rapidement l'acétylcholine. MARNAY et NACHMANSOHN (1937 *b* et 1938), FENG et TING (1938), COUTEAUX et NACHMANSOHN (1940), COUTEAUX (1942), montrèrent que l'activité cholinestérasique est en réalité nettement plus élevée dans la zone d'innervation motrice que dans les régions aneurales du muscle. Dans la zone d'innervation, cette activité est suffisante pour hydrolyser, pendant la période réfractaire, l'acétylcholine libérée à chaque influx (MARNAY et NACHMANSOHN, 1937 *a, b, c, d, e, et f*; MARNAY et NACHMANSOHN, 1938; NACHMANSOHN, 1939 *b et c*).

MARNAY et NACHMANSOHN (1937), MARNAY (1938 *a*) montrèrent que l'activité cholinestérasique des muscles varie beaucoup, non seulement pour les diverses classes de vertébrés, mais aussi à l'intérieur de ces classes, suivant la mobilité des animaux : l'activité cholinestérasique des muscles est ainsi 10 à 15 fois plus élevée chez le Lézard que chez la Tortue, 3 à 5 fois plus chez la Grenouille et deux fois plus chez les Mammifères. Ils montrèrent, par ailleurs, que la richesse en cholinestérase des muscles d'animaux rapides est liée à leur teneur relativement importante en phosphagène et à leur chronaxie faible, donc à leur travail (MARNAY, 1938; MARNAY et NACHMANSOHN, 1938). Les résultats de SAWYER (1943) et de LINDEMAN (1945) vinrent à l'appui de ces conclusions; le premier en montrant qu'un accroissement brusque du contenu cholinestérasique des muscles apparaît parallèlement aux mouvements répétés et rapides chez l'embryon de *Amblystoma punctatum*, le second en mettant en évidence une corrélation étroite entre l'activité cholinestérasique du système nerveux central et l'activité motrice générale d'animaux appartenant à diverses classes de vertébrés.

Ainsi, dès 1937, l'intervention d'une substance chimique dans la transmission de l'influx du nerf moteur au muscle était établie sur des bases concrètes, puisque la nature de cette substance et le mécanisme de sa destruction par un enzyme localisé dans la zone d'innervation motrice étaient connus.

Mais la description de plusieurs types de cholinestérases dans les différents tissus animaux et la mise en évidence de localisations cholinestérasiques dans le muscle en dehors de la zone d'innervation motrice montrèrent que le problème des cholinestérases dans le muscle était plus complexe que le laissait prévoir la théorie neuro-humorale sous sa première forme.

PLURALITÉ DES CHOLINESTÉRASES

ALLES et HAWES (1940), GLICK (1941), RICHTER et CROFT (1942), ZELLER et BISSEGER (1943) montrèrent que la spécificité des cholinestérases pour différents substrats (acétylcholine et ses dérivés méthylés, esters propionique et butyrique de la choline) dépend de la source d'enzymes. L'utilisation de diverses substances permit en outre à ZELLER (1942), ZELLER et BISSEGER (1943) d'inhiber sélectivement certaines préparations enzymatiques : ZELLER (1942) montra tout d'abord que la cholinestérase du sérum humain ou de Rat est beaucoup plus facilement inactivée par des dérivés de la pyrazolone que la cholinestérase du cerveau de ces mêmes espèces. ZELLER et BISSEGER (1943) obtinrent par la suite une inhibition sélective des enzymes du sérum par la percaïne, des enzymes du cerveau et des globules rouges par la caféine.

A la suite de ces travaux, une distinction entre les divers types de cholinestérases fut établie à partir de deux critères principaux : spécificité différente pour les substrats, inhibition sélective par les anticholinestérasiques.

1° Différenciation des divers types de cholinestérases par les substrats.

Les classifications ont été établies à partir de préparations purifiées dépourvues d'aliestérases.

En 1943, MENDEL et RUDNEY, MENDEL, MUNDEL et RUDNEY proposèrent une classification permettant de distinguer deux catégories d'enzymes : les « vraies cholinestérases » actives seulement vis-à-vis des esters de la choline, et les « pseudo-cholinestérases » actives à la fois sur des esters de la choline et des esters d'autres alcools tels la tributyrine, la tripropionine et le butyrate de méthyle.

— les « vraies » cholinestérases, présentes généralement dans les érythrocytes et le cerveau de diverses espèces animales, hydrolysent l'acétyl- β -méthylcholine, mais non pas la benzoylcholine. Inversement, les « pseudo » cholinestérases, présentes dans le sérum, hydrolysent seulement la benzoylcholine.

— L'activité enzymatique des « vraies » cholinestérases est maximale pour des concentrations d'acétylcholine nettement plus faibles que dans le cas des « pseudo ». En outre, les « vraies » cholinestérases sont inhibées partiellement par les fortes concentrations d'acétylcholine, tandis que l'hydrolyse de cet ester par les enzymes de type pseudo augmente avec la concentration du substrat.

Les recherches ultérieures montrèrent toutefois que la conception de MENDEL et de RUDNEY était trop absolue ou ne correspondait pas exactement aux faits :

— En effet, la spécificité de la « vraie » cholinestérase pour les esters de la choline ne s'avéra que relative : des préparations de « vraie » cholinestérase

hydrolysent non seulement la triacétine qui n'est pas un ester cholinique, mais encore elles l'hydrolysent, aux fortes concentrations, plus rapidement que l'acétylcholine (MAZUR et BODANSKY, 1946; AUGUSTINSSON, 1948; HOLTON, 1948; BLASCHKO et HOLTON, 1949). Cette hydrolyse, comme celle de l'acétylcholine, est très sensible à l'action des anticholinestérasiques.

— D'autre part, l'acétyl- β -méthylcholine et la benzoylcholine ne sont pas spécifiques dans certains cas de l'un et l'autre enzyme : le sérum de Porc contient une cholinestérase qui n'hydrolyse ni l'acétyl- β -méthylcholine, ni la benzoylcholine (LEVINE et SURAN, 1950), tandis que la cholinestérase du sérum de Poulet hydrolyse à une vitesse égale ces deux substrats (EARL et THOMPSON, 1952).

D'autre part, l'existence d'une vitesse maximale d'hydrolyse en fonction de la concentration du substrat n'est pas propre aux « vraies cholinestérasés » mais dépend aussi de l'ester considéré. En effet, les « pseudo-cholinestérasés » sont aussi inhibées partiellement par les fortes concentrations de benzoylcholine, mais non par celles de butyrylcholine (AUGUSTINSSON, 1948).

Une classification plus satisfaisante des cholinestérasés a pu être établie par STURGE et WHITTAKER (1950), MOUNTER et WHITTAKER (1950), à la suite des travaux de ADAMS (1949), ADAMS et WHITTAKER (1949).

Ces auteurs ont étudié systématiquement l'hydrolyse d'esters de la choline et d'esters aliphatiques, à radical acide variable, par des préparations purifiées de « vraies » et de « pseudo » cholinestérasés. Ils ont constaté que la vitesse d'hydrolyse décroît des acétates aux butyrates pour les « vraies » cholinestérasés et qu'au contraire, elle croît dans ce sens pour les « pseudo ». Ils ont proposé une classification établie à partir du radical acide pour lequel l'affinité est la plus grande : dans le cas le plus général, la « vraie » cholinestérase de MENDEL et RUDNEY correspond à une acétylcholinestérase; les « pseudo » cholinestérasés sont le plus souvent, soit des propionylcholinestérasés, soit des butyrylcholinestérasés.

2° Différenciation des divers types de cholinestérasés par les inhibiteurs.

L'ésérine (STEDMAN, 1926), puis la néostigmine (AESCHLIMANN et REINERT, 1931; EASSON et STEDMAN, 1937) avaient permis de distinguer les cholinestérasés des autres estérasés. Les inhibitions sélectives obtenues par ZELLER (1942), ZELLER et BISSEGER (1943), avec la percaïne, la caféine et des dérivés de la pyrazolone, permirent de différencier les préparations cholinestérasiques elles-mêmes. Par la suite, de nombreuses substances présentèrent des propriétés inhibitrices sélectives semblables vis-à-vis des « vraies » cholinestérasés ou des « pseudo » cholinestérasés.

Parmi les inhibiteurs des vraies cholinestérasés : la benzylimidazoline (SCHÄR WÜTHRICH, 1943), le chlorhydrate de β -dichlorodiéthyl-N-méthylamine (ADAMS et THOMPSON, 1948; THOMPSON, 1947), un analogue de la prostigmine, le Nu 1250 (N-p-chloro-phényl-N-méthylcarbamate de m-hydroxy-phényl-triméthylammonium (HAWKINS et MENDEL, 1949), des dérivés diphényles (COPP, 1953; AUSTIN et BERRY, 1953), des dérivés dicoumaranes (3318 CT) (FUNKE, JACOB et VON DÄNIKEN, 1953), le di-iodoéthylate du bis(2-diéthylaminoéthyl) téréphtalate (302 IS) (BOVET-NITTI et BOVET, 1953) et des diphénoxyalcans (2942 CT, 3116 CT, 3113 CT (FUNKE, BAGOT et DEPIERRE, 1954); DEPIERRE et FUNKE, 1954).

Parmi les inhibiteurs des pseudo-cholinestérasés : le tri-o-crésylphosphate (MENDEL et RUDNEY, 1944; EARL et THOMPSON, 1952), un analogue de la prostigmine, le Nu 683 (bromure du diméthylcarbamate du 2-hydroxy-5-phényl-benzyl-triméthylammonium) (HAWKINS et GUNTER, 1946), le di-isopropylfluorophosphate ou D. F. P. (MAZUR et BODANSKY, 1946; HAWKINS et MENDEL, 1947), le tétraéthylpyrophosphate ou TEPP (HALL et JACOBSON, 1948), le Mipafox (bis-

mono-isopropylamido-fluorophosphate (DAVISON, 1953; DENZ, 1954), le di-iodo-éthylate de *bis*(2-diéthylaminoéthyl)phtalate (306 IS) (BOVET-NITTI et BOVET, 1953).

Le critère d'inhibition sélective présente, comme celui de spécificité des substrats, des incertitudes dues à la nature différente des diverses sources enzymatiques. Une variation dans la sélectivité a été, en particulier, observée pour le D. F. P. (ORD et THOMPSON, 1950; KOELLE, 1955). Ce critère est cependant un complément indispensable à l'identification des enzymes, basée sur la spécificité vis-à-vis des substrats dans certains cas particuliers : ainsi, la propionylcholinestérase du cœur de Rat se comporte vis-à-vis des inhibiteurs comme une butyrylcholinestérase (ORD et THOMPSON, 1951; MYERS, 1952 et 1953).

De ces différents travaux, il résulte que l'identification précise des cholinestérases repose sur :

- leur affinité particulière pour les esters de la choline par rapport aux autres esters;

- la spécificité de l'enzyme pour un ester déterminé de la choline qui peut être acétique, propionique ou butyrique;

- l'inhibition de l'hydrolyse considérée par un anticholinestérasique spécifique. En effet, la spécificité d'un enzyme pour un substrat n'est que préférentielle mais non qualitative; l'enzyme est susceptible d'hydrolyser à des vitesses différentes divers esters de la choline.

Des dosages réalisés sur des muscles striés humains par LANGEMANN (1944), du Chat et du Lapin par NACHMANSOHN et ROTHENBERG (1945), du Cobaye par BROOKS et MYERS (1952), du Rat par ORD et THOMPSON (1950), du Poisson par AUGUSTINSSON (1948), il est apparu que le système cholinestérasique du muscle strié est surtout représenté par une acétylcholinestérase : 5 % seulement de l'activité cholinestérasique totale peut être attribuée à une butyrylcholinestérase (BROOKS et MYERS, 1952).

Il était ainsi généralement admis que l'activité de la butyrylcholinestérase dans les muscles est faible. Les résultats obtenus par plusieurs auteurs sur le diaphragme de Rat révélèrent cependant quelques divergences. ORD et THOMPSON (1950) avaient conclu à l'absence d'une butyrylcholinestérase dans ce muscle. Avec la même méthode de dosage, mais en utilisant non pas la benzoylcholine mais la butyrylcholine, DENZ (1953), DAVISON (1955) constatèrent que l'activité butyrylcholinestérasique de ce muscle est importante. La présence de cet enzyme fut confirmée par d'autres auteurs avec des méthodes différentes : BARNES et DUFF (1953) en étudiant la potentialisation de la réponse de ce muscle par des inhibiteurs spécifiques de la butyrylcholinestérase, DENZ (1954) par l'emploi parallèle de techniques biochimiques et histochimiques.

La mise au point de techniques histochimiques, en particulier de celle de KOELLE et FRIEDENWALD (1949), qui utilise des substrats de spécificité différente, devait permettre en effet non seulement de localiser mais d'identifier les enzymes.

Cette méthode a permis tout d'abord de situer l'activité cholinestérasique

sique de la zone d'innervation motrice au niveau de la plaque motrice (KOELLE, 1950), et de façon plus précise dans l'appareil sous-neural de la synapse chez les Mammifères et les Batraciens (COUTEAUX et TAXI, 1951; COUTEAUX, 1951; COUTEAUX, 1952). COUTEAUX (1953), GEREBTZOFF (1954) ont ensuite montré qu'une activité cholinestérasique importante est située au niveau des insertions tendineuses des fibres musculaires, en dehors de tout élément nerveux. Ces travaux imputaient à l'acétylcholinestérase la presque totalité de l'activité cholinestérasique non seulement au niveau de la jonction neuro-musculaire où sa présence s'accorde avec le rôle que lui attribue la théorie de la transmission chimique de l'influx nerveux, mais aussi au niveau des insertions tendineuses des muscles où son existence pose le problème de son rôle.

DENZ (1953 et 1954), en prolongeant le temps d'incubation avec la butyrylthiocholine, montrait que cet ester spécifique de la butyrylcholinestérase est hydrolysé au niveau des plaques motrices du diaphragme de Rat. Il montrait, en outre, que la méthode histochimique ne rend pas compte en totalité de l'activité butyrylcholinestérasique moyenne du muscle; l'activité butyrylcholinestérasique était plus faible au niveau des synapses que dans les broyats.

En somme, en 1954, il était en général admis que dans les muscles striés, l'acétylcholinestérase est seule représentée ou du moins qu'elle l'est en prédominance. Cet enzyme était le seul mis en évidence au niveau des deux principales localisations cholinestérasiques du muscle strié : la jonction neuro-musculaire et la jonction musculo-tendineuse.

Les avis sur le diaphragme de Rat étaient cependant partagés. Les divergences résultaient en partie des techniques : utilisation de substrats plus ou moins rapidement hydrolysés et de techniques mettant en évidence des phénomènes différents. Elles résultaient surtout apparemment de la nature particulière du diaphragme.

Le problème se posait donc de savoir si le diaphragme de Rat est un cas particulier ou si le système cholinestérasique du muscle strié peut présenter, suivant les espèces animales, des variations. La revue des résultats montrait, d'autre part, la nécessité d'utiliser des techniques suffisamment précises et de confronter les résultats obtenus avec les divers types de techniques.

L'importance de la sensibilité des techniques a été confirmée pendant l'élaboration de notre travail. HOLMSTEDT (1957 *b*) a mis en évidence une butyrylcholinestérase dans les plaques motrices du *biceps femoris* du Chat, alors que KOELLE (1950), se limitant à de courts temps d'incubation, avait conclu à son absence dans les muscles de cet animal. GIACOBINI (1959) a pu doser, par la « *Cartesian diver technique* » de Linderström-Lang, une activité assez importante de la butyrylcholinestérase dans les plaques motrices du muscle droit abdominal du Rat.

II. — MATÉRIEL ET TECHNIQUE

Nous avons repris l'étude du système cholinestérasique du muscle strié en utilisant trois techniques, biochimique, pharmacologique et histochemique auxquelles nous avons apporté certaines modifications destinées à en accroître la précision. Nous avons étendu nos recherches à des muscles d'animaux appartenant à trois classes de vertébrés.

TECHNIQUES

Les trois techniques utilisées mettent en évidence des phénomènes différents : le dosage biochimique rend compte de l'activité cholinestérasique moyenne du muscle; le test histochemique de l'activité enzymatique liée à des structures; la méthode pharmacologique apporte, enfin, des précisions sur les caractéristiques fonctionnelles des enzymes.

L'utilisation conjointe de ces trois techniques devait permettre, en outre, à partir des concordances ou des discordances relevées entre les résultats, d'apporter des précisions sur l'identification, la localisation et les fonctions des enzymes.

L'identification des enzymes a été réalisée par l'emploi systématique, dans les trois techniques, de substrats de spécificité différente et d'anticholinestérasiques permettant de bloquer, à volonté, la totalité des cholinestérasas à l'exclusion des autres estérasas ou préférentiellement l'un des deux types d'enzymes.

Les substrats ont été l'acétylcholine, la propionylcholine et la butyrylcholine dans les expériences biochimiques et pharmacologiques; l'acétylthiocholine et la butyrylthiocholine dans les expériences biochimiques et histochemiques.

Nous avons utilisé comme inhibiteurs :

— le méthylsulfate de l'ester carbanique de 3-hydroxy-phényl-triméthylammonium ou Néostigmine.

La Néostigmine, synthétisée en 1926 par STEDMAN et introduite par AESCHLI-MANN et REINERT, en 1931, est, comme l'ésérine, un inhibiteur spécifique des cholinestérasas (les arylestérasas et autres estérasas aliphatiques n'étant pas affectées (AMMON, 1933; EASSON et STEDMAN, 1936 et 1937). Son action inhibitrice est réversible et compétitive (GOLDSTEIN et coll., 1949; GOLDSTEIN, 1951).

— Le di-iosopropylfluorophosphate ou D. F. P.

Ce produit a été synthétisé, en 1941, par MC COMBIE et SAUNDERS. Il inhibe de façon irréversible les deux types de cholinestérasas. Aux faibles doses, son action est sélective des X cholinestérasas (MAZUR et BODANSKI, 1946; KOELLE et GILMAN, 1946; HAWKINS et MENDEL, 1947; ADAMS et THOMPSON, 1948).

— Le di-iodométhylate de la *bis*(piperidinométhyl-coumaranyl-5) cétone ou 3318 CT.

Ce produit a été synthétisé dans le laboratoire de Chimie Thérapeutique de l'Institut Pasteur, par FUNKE et VON DÄNIKEN (1953). Il est, *in vitro*, un inhibiteur puissant de diverses acétylcholinestérases du Chien (FUNKE, JACOB et VON DÄNIKEN, 1953; JACOB et FUNKE, 1953; JACOB, 1954 a), du Chat (1954 b), de globules rouges de l'Homme (JACOB, 1955) et d'enzymes du Lapin, du Rat, du Cheval et du Porc (PAULESU et VARGIV, 1955).

CHOIX DES MUSCLES

Nous avons étudié la nature, la localisation et le rôle pharmacologique du système cholinestérasique de muscles d'animaux appartenant à trois classes de vertébrés : Batraciens, Poissons et Mammifères. Nous avons tenté d'établir, d'autre part, pour une même espèce animale, s'il existe une relation entre des facteurs distinctifs (anatomiques ou physiologiques) et le système cholinestérasique de ces muscles.

Nous avons étudié, chez les *Batraciens*, le muscle droit abdominal (ou *rectus*) de la Grenouille (*Rana esculenta*).

Ce choix nous a paru particulièrement adapté à cette étude en raison de l'utilisation générale de ce muscle en pharmacologie comme test de dosage des esters de la choline. En outre, les potentialisations par l'ésérine des esters acétique, propionique et butyrique de la choline, obtenues sur ce muscle par CHANG et GADDUM (1933), permettaient de penser qu'il contient un système enzymatique capable d'hydrolyser, *in vivo*, dans les conditions pharmacologiques, non seulement l'acétylcholine, mais aussi la propionylcholine et la butyrylcholine, en apport exogène. Le problème de l'identification de ces cholinestérases restait cependant posé, de même et surtout que celui de leur intervention dans les potentialisations. En effet, MIQUEL (1946) avait obtenu une sensibilisation du rectus de Grenouille à l'acétylcholine, qu'il pensait indépendante de l'inhibition des cholinestérases.

L'étude du rectus de Grenouille a été réalisée de façon détaillée avec les trois techniques, ce qui a permis de les éprouver et de discuter de la valeur des recoupements possibles entre les méthodes. Elle fournit ainsi des bases pour l'étude ultérieure des muscles de Poissons et de Mammifères.

L'étude chez les *Poissons* a été réalisée sur le muscle latéral du Poisson-chat (*Ameiurus nebulosus*). Ce muscle présentait un double avantage : celui d'avoir fait l'objet d'une étude qui avait mis en évidence des propriétés anatomiques (BARETS, 1952) et électrophysiologiques (BARETS, 1955) comparables à celles déjà signalées pour les muscles de la Grenouille en général et pour le rectus de la Grenouille en particulier; celui,

d'autre part, de présenter, *a priori*, un système cholinestérasique différent. En effet :

1° Le rectus de Grenouille et le muscle latéral superficiel du Poisson-chat sont constitués de fibres parallèles; leur faible épaisseur facilite l'accès des substances dépolarisantes aux récepteurs. Ils sont divisés transversalement en myomères par des myoseptes parallèles permettant d'obtenir des portions de fibres complètes non lésées, nécessaires dans les expériences pharmacologiques.

Le muscle latéral du Poisson-chat contient deux catégories de fibres dont les caractéristiques structurales et électrophysiologiques se rapprochent des deux sortes de fibres de la Grenouille appartenant aux systèmes de contraction lent et rapide définis par KUFFLER (1953). Ces deux sortes de fibres sont réunies dans le muscle abdominal de la Grenouille. Par contre, chez le Poisson-chat, les deux systèmes sont séparés; le muscle latéral superficiel se rapproche du « système lent », le muscle latéral profond du « système rapide ». Cette séparation en permet l'étude distincte.

2° Si les sensibilisations obtenues par CHANG et GADDUM (1933) permettaient de soupçonner l'existence de cholinestérases hydrolysant aussi bien la butyrylcholine et la propionylcholine que l'acétylcholine dans le rectus de Grenouille, tous les travaux, biochimiques en particulier, réalisés sur différentes espèces de Poissons (AUGUSTINSSON, 1948; SIOU, 1955), s'accordaient pour montrer l'absence presque complète d'un enzyme de ce type dans les muscles de ces Vertébrés.

Nous avons étendu notre étude chez le Poisson à celle des organes électriques de deux espèces, le Malaptérure (*Malapterurus electricus*) et le Gnathonemus (*Gnathonemus senegalensis elongatus*). L'origine musculaire des organes électriques est en effet connue depuis longtemps (BABUCHIN, 1876; FRITSCH, 1883; EWART, 1892; ENGELMANN, 1894; OGNEFF, 1897; DALHGREN, 1914; WHITE, 1918). SZABO (1957) a précisé que l'organe électrique de *Gnathonemus* est un système rapide par les caractéristiques de sa réponse et provient de la différenciation de myoblastes du muscle latéral profond; il n'est donc qu'un cas particulier du muscle latéral profond.

Seule l'origine de l'organe électrique du Malaptérure faisait l'objet de controverses en raison de ses propriétés particulières; après MAURER (1913), JOHNELS a apporté la preuve de son origine musculaire en 1956.

L'étude des organes électriques dans le cadre de ce travail était ainsi tout indiquée pour montrer dans quelle mesure une différenciation fonctionnelle peut entraîner une différenciation enzymatique.

L'étude des muscles de Mammifères a été orientée surtout sur la différenciation du système cholinestérasique des muscles « blancs rapides » et des muscles « rouges lents ».

En effet, les travaux réalisés sur le diaphragme du Rat, muscle rouge,

signalaient la concentration relativement importante de ce muscle en butyrylcholinestérase. D'autre part, la sensibilité très différente au décaméthonium et à la d-tubocurarine du soléaire et des muscles de la respiration, muscles « rouges lents », d'une part, du tibial antérieur du Chat, muscle « blanc rapide », d'autre part, incitait à rechercher dans quelle mesure cette différenciation fonctionnelle pouvait être en relation avec le système cholinestérasique.

L'étude biochimique a été faite sur différents muscles rouges et blancs du *Cobaye*, du *Rat*, du *Chat*, du *Lapin*. La répartition des enzymes a été recherchée sur les diaphragmes du *Cobaye* et du *Rat*, en raison des particularités de leur activité cholinestérasique, mise en évidence par les dosages biochimiques. Nous avons adjoint à cette étude histochemique celle de différents muscles de Singe pour lesquels HÄGGQVIST (1960) avait mis en évidence, au niveau des synapses, des systèmes cholinestérasiques qualitativement différents en relation avec la nature de l'innervation motrice.

III. — MUSCLE DROIT ABDOMINAL (RECTUS) DE LA GRENOUILLE

Le rectus de Grenouille présente des propriétés anatomiques, physiologiques et biochimiques qui ont permis l'étude de son système cholinestérasique dans les meilleures conditions.

Ce muscle est constitué de deux parties symétriques, reliées par une aponévrose le long de la ligne ventrale médiane et divisées chacune en quatre myomères. Deux propriétés anatomiques expliquent son utilisation générale comme test de dosage des esters de la choline : d'une part, sa faible épaisseur permet une accessibilité rapide et homogène des substances dépolarisantes aux récepteurs; d'autre part, la disposition parallèle de ses fibres favorise l'enregistrement des réponses.

Sa réponse à des stimuli (mécanique, électrique ou chimique) est une contraction lente et soutenue. Ce muscle appartient aux muscles « toniques » décrits par SOMMERKAMP (1928), WACHHOLDER et VON LEDEBUR (1930 et 1931), WACHHOLDER et NOTHMANN (1952).

Le comportement « tonique » du rectus de Grenouille correspond à la présence de fibres lentes qui, en plus de leur innervation spécifique par les petites fibres « lentes » (« small nerve system » de KUFFLER et VAUGHAN WILLIAMS, 1953 *a* et *b*), se distinguent des fibres rapides — en plus grande quantité — par des propriétés morphologiques (KRÜGER, 1929; KRÜGER et FURLINGER, 1931; KRÜGER, DUSPIVA et FURLINGER, 1933; COUTEAUX, 1952 et 1955; GRAY, 1958) et des propriétés histochemiques COUTEAUX, 1953 et 1956).

L'étude histochemique de ce muscle est en outre facilitée par la

disposition parallèle des fibres à l'intérieur de myomères de faible dimension. Il est en effet possible d'examiner sur une seule préparation l'ensemble des structures aneurales, synaptiques et tendineuses, présentes sur un même plan longitudinal.

Enfin, nous avons vu, dans l'introduction, que les essais antérieurs de CHANG et GADDUM (1933) permettaient de penser que le système cholinestérasique de ce muscle est capable d'hydrolyser dans les conditions pharmacologiques non seulement l'acétylcholine, mais aussi la propionylcholine et la butyrylcholine. Le système cholinestérasique de ce muscle apparaissait donc particulier.

Une partie des résultats a fait l'objet de publications préliminaires (JACOB et DECHAVASSINE, 1955 et 1956; JACOB et PECOT-DECHAVASSINE, 1958; PECOT-DECHAVASSINE, 1958).

Toutes les expériences ont été réalisées sur les muscles droits de l'abdomen de *Rana esculenta* des deux sexes. Les Grenouilles ont été conservées, soit dans un aquarium dont l'eau était régulièrement renouvelée, soit à une température de $+4^{\circ}$ C dans une atmosphère humide.

A. — ÉTUDE BIOCHIMIQUE

MÉTHODES

1° *Extraits*. — Les muscles sont finement hachés avec des ciseaux, puis triturés, avec 5 volumes d'une solution à 0,025 M de bicarbonate de sodium, dans un mortier préalablement refroidi à -25° C. Ce procédé nous a donné de meilleurs rendements que le microbroyage, sans doute parce qu'il provoque un éclatement des tissus par les cristaux de glace, en évitant tout échauffement susceptible d'altérer le système enzymatique. Les suspensions, d'aspect blanchâtre, sont débarrassées des lambeaux d'aponévroses par filtration sur une mousseline en nylon. Les déterminations sont faites avec un millilitre de cette suspension, soit 0,2 g de muscle.

2° *Substrats et inhibiteurs*. — Toutes les dilutions de substrats et d'inhibiteurs sont faites dans la même solution de bicarbonate que les extraits musculaires.

Les substrats utilisés sont les chlorures d'acétylcholine, de propionylcholine, le chlorure ou le perchlorate de butyrylcholine et les iodures d'acétylthiocholine et de butyrylthiocholine. Les concentrations terminales sont de 0,01 M, dans tous les cas, sauf pour la butyrylcholine où elle est de 0,03 M.

Les solutions de 3318 CT et de Néostigmine sont préparées extemporanément à partir des produits cristallisés.

Le D. F. P. pur, en ampoule, est tout d'abord dissous, à raison de 2 %,

dans du propylène glycol. Les dilutions sont préparées extemporanément à partir de cette solution de base conservée, entre temps, en chambre froide.

3° *Détermination des activités cholinestérasiques.* — La détermination des activités cholinestérasiques est faite avec la méthode manométrique classique de WARBURG-AMMON (AMMON, 1933).

Le contenu des cupules est amené à pH 7,4 par barbotage, pendant dix minutes, d'un mélange gazeux constitué de 95 % d'azote et 5 % de gaz carbonique. On attend ensuite dix minutes pour vérifier l'étanchéité des manomètres et assurer l'équilibration thermique du contenu des cupules à 37° C ($\pm 0,1^\circ$ C).

Les dégagements de CO₂ sont relevés toutes les 20 minutes, à partir de la troisième minute suivant l'addition du substrat. En raison de la lenteur des hydrolyses, nous poursuivons les lectures pendant deux heures pour que la comparaison des activités cholinestérasiques soit faite à partir de dégagements de CO₂ plus importants et ainsi sujets à une moindre erreur relative. Des lectures intercalaires régulières permettent de vérifier que le substrat ne s'épuise dans aucun des cas.

L'hydrolyse enzymatique des substrats a été calculée en déduisant des dégagements totaux de CO₂, ceux dus à l'hydrolyse spontanée des substrats et à la lyse des tissus.

Dans les expériences d'inhibition, l'anticholinestérasique est ajouté à l'extrait musculaire, une heure avant l'addition du substrat; l'incubation a lieu pendant environ une demi-heure à la température du laboratoire; elle se poursuit ensuite pendant une demi-heure à 37° C.

L'inhibition est calculée en pourcentage de l'activité enzymatique témoin. La concentration de l'inhibiteur produisant une inhibition de 50 % (CI 50) est déterminée graphiquement par interpolation.

RÉSULTATS

1° *Hydrolyse enzymatique par les broyats de rectus de Grenouille, des esters de la choline et de la thiocholine (tableau I).*

L'acétylcholine est plus rapidement hydrolysée ($207,5 \mu\text{l CO}_2 \pm 10,3/0,2$ g/120 mn) que ses homologues supérieurs. Viennent ensuite la propionylcholine ($96,4 \pm 3,2$) et la butyrylcholine ($60,1 \pm 1,3$). Les dégagements obtenus avec les esters de la thiocholine — respectivement de $268,6 \pm 11,8$ pour l'acétylthiocholine et de $89,2 \pm 5,7$ pour la butyrylthiocholine — sont nettement plus importants que ceux relevés pour les esters correspondants de la choline.

Il existe de grandes variations individuelles. Nous n'avons pas pu mettre en évidence de variations saisonnières.

TABLEAU I. — HYDROLYSE DES ESTERS DE LA CHOLINE ET DE LA THIOCHOLINE PAR LES BROYATS DE RECTUS DE GRENOUILLE

Expériences	Acétylcholine 0,01 M			Propionylcholine 0,01 M			Butyrylcholine 0,03 M			Acétylthiocholine 0,01 M			Butyrylthiocholine 0,01 M		
	Dates	$\mu\text{l CO}_2$ (l)		Dates	$\mu\text{l CO}_2$		Dates	$\mu\text{l CO}_2$		Dates	$\mu\text{l CO}_2$		Dates	$\mu\text{l CO}_2$	
1.	8-7-1955	179,5		7-9-1956	96,8		8-9-1955	39,2		15-4-1957	286,3		5-8-1957	73,4	
2.	12-7	154,8		11-9	104,9		9-9	45,1		23-4	322,7		6-8	78,8	
3.	18-7	175,2		12-9	94,8		13-9	44,8		17-6	216,9		12-11	104,6	
4.	21-7	160,1		14-9	104,6		21-9	39,2		18-6	258		13-11	96,8	
5.	14-9	116,7		17-9	95,6		26-9	46,7		26-6	341,6		19-11	92,6	
6.	3-10	181,8		19-9	80,7		27-9	39,4		6-8	320				
7.	6-10	242,3		24-9	75,3		30-9	62,3		24-9	289,2				
8.	9-11	208,7		25-9	98,8		3-10	55,4		8-10	233,2				
9.	3-11	292,3		27-9	98,8		23-10	63,8		9-10	243,1				
10.	9-12	214,1		1-10	111,8		28-10	80,4		15-10	233,2				
11.	12-12	213,6		8-10	88,4		15-11	53,6		22-10	237,2				
12.	23-12	223,1		9-10	106,4		12-12	66,4		23-10	228,9				
13.	13-1-1956	246,6					13-12	47,4		29-10	317,4				
14.	30-1	200,8					14-12	52,4		4-11	234				
15.	4-6	302,4					23-12	60,9							
16.	7-9	243					17-1-1956	62,8							
17.	15-10-1957	194,4					13-2	58							
18.	22-10	184,8					29-3	63,6							
19.	30-10	251,1					1-6	79,2							
20.	5-10	164,4					4-6	126,3							
21.							12-11	81,6							
22.							13-11	56,3							
Moyenne		207,5			96,4			60,1			268,6			89,2	
n		20			12			22			14			5	
Δs		46,3			10,6			6,1			42,7			12,8	
es		10,3			3,2			1,3			11,8			5,7	

(1) Activités exprimées en μl de $\text{CO}_2/0,2$ g de muscle/120 minutes.n : nombre de déterminations; Δs : déviation standard; es : erreur standard de la moyenne.

2° Effets des anticholinestérasiques.

a) *Néostigmine*. — Les résultats varient selon que les inhibitions sont calculées 20 minutes ou 120 minutes après l'addition du substrat (fig. 1). Pour les 20 premières minutes, les courbes obtenues avec les trois esters de la choline sont très semblables, aux erreurs d'expérience près. Les CI 50 sont respectivement de $1,1 \cdot 10^{-7}$ M, $1,8 \cdot 10^{-7}$ M et $1,4 \cdot 10^{-7}$ M pour l'acétylcholine, la propionylcholine et la butyrylcholine (tableau II).

Après 120 minutes de contact avec les substrats, les CI 50 sont plus

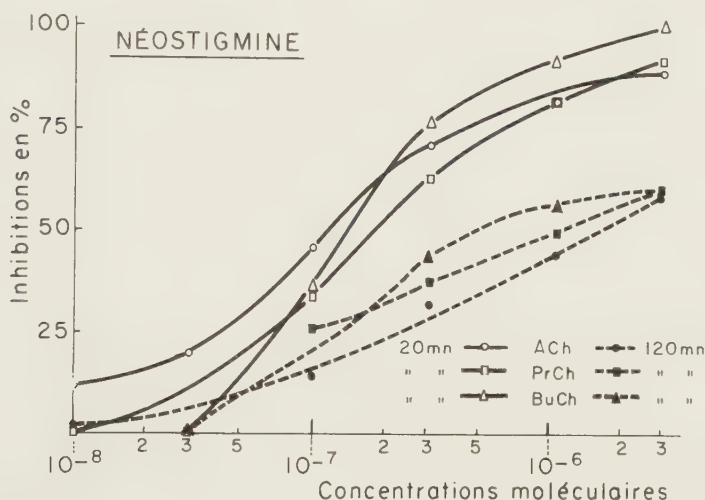


FIG. 1. — Rectus de Grenouille. Inhibition, *in vitro*, par la Néostigmine de l'hydrolyse des esters de la choline.

En abscisses : concentrations moléculaires de Néostigmine (échelle logarithmique).

En ordonnées : inhibition (en %).

L'inhibition est déterminée 20 minutes (trait plein) et 120 minutes (tirets) après l'addition du substrat au complexe enzyme-inhibiteur.

élevées : $1,5 \cdot 10^{-6}$ M, $1,1 \cdot 10^{-6}$ M et $5 \cdot 10^{-7}$ M. La diminution de l'inhibition est donc plus importante pour l'acétylcholine et la propionylcholine que pour la butyrylcholine. Elle résulte du phénomène de « Slow-displacement », décrit par GOLDSTEIN et coll. (1949), BURGEN (1949), GOLDSTEIN (1951), qui correspond au déplacement de l'inhibiteur par le substrat et, probablement aussi, à l'hydrolyse enzymatique de l'inhibiteur (GOLDSTEIN et HAMLISCH, 1952).

L'affinité de l'enzyme (ou des enzymes) apparaît ainsi plus grande pour les esters acétique et propionique que pour l'ester butyrique.

TABLEAU II

INHIBITION DES ACTIVITÉS CHOLINESTÉRASIQUES PAR LA NÉOSTIGMINE.
CONCENTRATIONS INHIBITRICES 50 % (CI 50)

Esters de la choline	CI 50	
	20 minutes	120 minutes
Acétylcholine	$1,1 \cdot 10^{-7}$ M	$1,5 \cdot 10^{-6}$ M
Propionylcholine	$1,8 \cdot 10^{-7}$ M	$1,1 \cdot 10^{-6}$ M
Butyrylcholine	$1,4 \cdot 10^{-7}$ M	$5 \cdot 10^{-7}$ M

L'inhibition est déterminée 20 minutes et 120 minutes après l'addition du substrat au complexe enzyme-inhibiteur.

b) Le D.F.P. (fig. 2) inhibe très différemment les hydrolyses de l'acétylcholine et de la butyrylcholine.

La concentration inhibitrice 50 % ($3 \cdot 10^{-9}$ M) obtenue pour la *butyryl-*

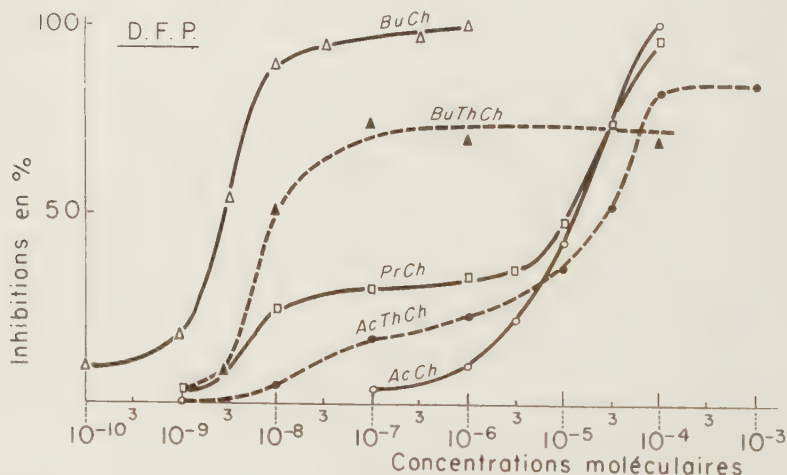


FIG. 2. — Rectus de Grenouille. Inhibition, *in vitro*, par le D. F. P. de l'hydrolyse des esters de la choline et de la thiocholine.

En abscisses : concentrations moléculaires de D. F. P. (échelle logarithmique).
En ordonnées : inhibition (en %).

choline est environ 4 000 fois plus faible que celle relevée pour l'*acétyl-*
choline ($1,3 \cdot 10^{-5}$ M). L'hydrolyse de la butyrylcholine est presque tota-
lement supprimée (95 %) à la concentration de $1 \cdot 10^{-7}$ M, alors que celle
de l'acétylcholine ne l'est que dans les limites des erreurs expérimenta-
les (5 %).

La courbe de la *propionylcholine* se décompose très nettement en deux parties séparées par un long palier; dans la première, l'inhibition atteint 30 % pour les concentrations de D. F. P. de $1 \cdot 10^{-8}$ M à $3 \cdot 10^{-7}$ M, qui ne modifient pas l'hydrolyse de l'acétylcholine mais inhibent celle de la butyrylcholine d'environ 95 %; dans la seconde, débutant aux concentrations de $1 \cdot 10^{-6}$ M — $3 \cdot 10^{-6}$ M, l'inhibition progresse comme celle de l'acétylcholine.

La courbe de l'*acétylthiocholine* se décompose de façon similaire en deux parties; le palier de séparation est cependant plus étroit. Situé

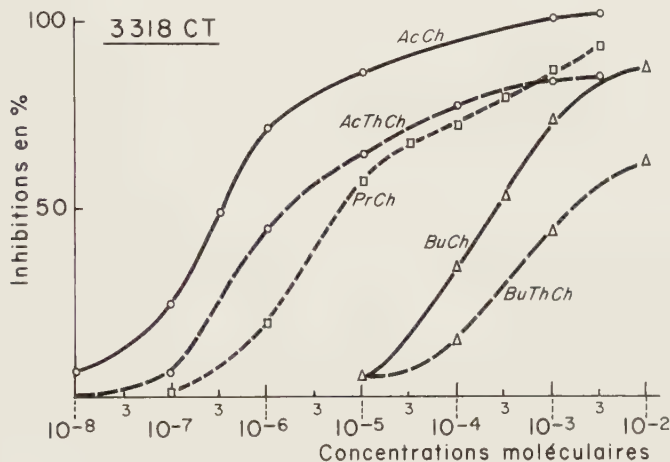


FIG. 3. — Rectus de Grenouille. Inhibition, *in vitro*, par le 3318 CT de l'hydrolyse des esters de la choline et de la thiocholine.

En abscisses : concentrations moléculaires de 3318 CT (échelle logarithmique).

En ordonnées : inhibition (en %).

approximativement entre les concentrations de $1 \cdot 10^{-7}$ M et $3 \cdot 10^{-7}$ M, il correspond à une inhibition de 15 %. La courbe de la *butyrylthiocholine* suit, légèrement déplacée vers la droite, celle de la butyrylcholine.

En outre, on constate que les courbes des deux esters de la thiocholine plafonnent pour des inhibitions nettement incomplètes; des concentrations de D. F. P., qui inhibent totalement les hydrolyses des esters correspondants de la choline, laissent persister une hydrolyse d'environ 15 % pour l'acétylthiocholine et de 30 % pour la butyrylthiocholine.

c) Comme le D. F. P., le 3318 CT inhibe de façon très différente les hydrolyses de l'acétylcholine et de la butyrylcholine. Mais la spécificité de l'inhibition est inversée (fig. 3).

Les CI 50 sont respectivement de $3,3 \cdot 10^{-7}$ M et de $3 \cdot 10^{-4}$ M pour l'acétylcholine et la butyrylcholine.

La sélectivité est toutefois inférieure à celle du D. F. P.; l'hydrolyse de l'acétylcholine ne peut être inhibée de plus de 85 %, sans que celle de la butyrylcholine soit affectée.

Le 3318 CT n'est pas soluble aux concentrations supérieures à $3 \cdot 10^{-3}$ M. Pour cette raison, nous n'avons pu obtenir une inhibition totale de l'hydrolyse de la butyrylcholine.

La courbe de la propionylcholine est intermédiaire entre celles de l'acétylcholine et de la butyrylcholine. La CI 50 est de $7 \cdot 10^{-6}$ M. Elle présente un palier de séparation, correspondant à une inhibition de 70 %, situé entre les concentrations de $1 \cdot 10^{-5}$ M et $1 \cdot 10^{-4}$ M. Ce palier est moins net cependant que dans le cas du D. F. P., en raison de la plus faible sélectivité du 3318 CT.

Les courbes des deux esters de la thiocholine sont très proches de celles de leurs homologues de la choline, mais légèrement déplacées vers la droite. Les CI 50 sont respectivement de $2 \cdot 10^{-6}$ M et $2 \cdot 10^{-3}$ M pour l'acétylthiocholine et la butyrylthiocholine. On n'obtient pas d'inhibition complète aux concentrations de 3318 CT à la limite de solubilité; il persiste un résidu d'environ 15 % pour l'ester acétique et 35 % pour l'ester butyrique.

DISCUSSION

Les broyats de rectus de Grenouille hydrolysent à des vitesses différentes les esters acétique, propionique et butyrique de la choline, ainsi que les esters acétique et butyrique de la thiocholine. Les esters acétiques sont plus rapidement hydrolysés que les esters butyriques. La propionylcholine occupe une place intermédiaire entre l'acétylcholine et la butyrylcholine. Les dégagements de CO_2 sont nettement plus importants pour les esters de la thiocholine que pour leurs homologues choliniques. Un phénomène semblable a été observé avec d'autres préparations enzymatiques par GLICK (1939), KOELLE (1950), AUGUSTINSSON et THORHILD ISACHSEN (1957).

Ces derniers auteurs ont montré que les dégagements totaux obtenus avec les esters de la thiocholine sont supérieurs aux dégagements théoriques résultant du clivage des esters en acide et base. Ils émettent l'hypothèse qu'une partie des dégagements est due à l'action secondaire sur le tampon de la thiocholine libérée qui posséderait, comme l'amine tertiaire analogue, des propriétés acides au pH 7,4 de la réaction. Ils s'appuient sur des travaux de HANSEN (non publiés) et sur les résultats de KOELLE (1955) qui montrent que les dégagements de CO_2 avec les esters de la thiocholine sont plus importants à pH 8 qu'à pH 6,4.

L'emploi d'inhibiteurs inactivant spécifiquement les cholinestérases ou

préférentiellement l'un des deux types devait permettre de savoir si ces diverses hydrolyses résultent de l'intervention d'un seul enzyme spécifique ou, au contraire, de plusieurs enzymes de spécificité différente.

La Néostigmine inhibe totalement l'hydrolyse des esters de la choline (la fraction résiduelle d'environ 10 %, observée pour l'acétylcholine et la propionylcholine après 20 minutes de contact des substrats avec le complexe enzyme-inhibiteur, résulte, nous l'avons vu, du phénomène de « slow-displacement »). L'hydrolyse enzymatique des esters de la choline est donc attribuable, dans sa totalité, à des estérases de type cholinestérases.

Le D. F. P. et le 3318 CT permettent de différencier les hydrolyses de l'acétylcholine et de la butyrylcholine. La première est inhibée par les faibles doses de 3318 CT et seulement par des concentrations élevées de D. F. P. L'inverse est obtenu pour l'ester butyrique : son hydrolyse est empêchée par les faibles doses de D. F. P. et uniquement par les fortes concentrations de 3318 CT.

Les broyats de rectus de Grenouille contiennent donc deux cholinestérases différentes : l'une, hydrolysant l'acétylcholine et inhibée sélectivement par les faibles doses de 3318 CT, se comporte comme une acétylcholinestérase; l'autre, hydrolysant la butyrylcholine et inactivée par les faibles doses de D. F. P., peut être considérée comme une butyrylcholinestérase.

Les inhibitions des hydrolyses de l'acétylcholine et de la butyrylcholine sont absolument distinctes; le chevauchement observé est dans la limite des erreurs expérimentales. Chacun des deux enzymes intervient donc peu, s'il le fait, dans l'hydrolyse de l'ester « non spécifique ».

L'hydrolyse de la propionylcholine ne peut être attribuée à un seul enzyme : elle est réduite de 30 % par les concentrations de D. F. P. qui inhibent totalement l'hydrolyse de la butyrylcholine. Pour des concentrations de D. F. P. nettement supérieures, l'inhibition progresse comme celle de l'acétylcholine. L'inverse est observé avec le 3318 CT : les faibles doses de cet inhibiteur, inactivant totalement l'acétylcholinestérase, inhibent son hydrolyse à raison de 70 %.

La propionylcholine est donc inactivée par deux enzymes : l'acétylcholinestérase et la butyrylcholinestérase, responsables respectivement de 70 et 30 % de son hydrolyse.

L'hydrolyse des esters de la thiocholine est très voisine de celle de leurs homologues de la choline : l'acétylthiocholine se rapproche de l'acétylcholine, la butyrylthiocholine de la butyrylcholine (tableau III). Cependant, deux différences apparaissent : la courbe d'inhibition par le D. F. P. de l'hydrolyse de l'acétylthiocholine présente un palier comme celle de la propionylcholine. L'hydrolyse de l'acétylthiocholine est donc assurée en prédominance par l'acétylcholinestérase, mais aussi en partie, dans la proportion de 15 %, par la butyrylcholinestérase.

En outre, un résidu d'activité — d'environ 15 % pour l'acétylthiocholine et 30 % pour la butyrylthiocholine — persiste pour les concentrations maximales d'inhibiteurs utilisées. Le phénomène a été signalé par KOELLE (1955), dans le cas d'autres extraits tissulaires; cet auteur pensait, à la suite de SACHS et coll. (1954), qu'il était dû à l'existence de

TABLEAU III

RECTUS DE GRENOUILLE.
CONCENTRATIONS DE D. F. P. ET DE 3318 CT INHIBANT DE 50 %
L'HYDROLYSE DES ESTERS DE LA CHOLINE ET DE LA THIOCHOLINE

Esters		Concentrations (M) inhibitrices 50 %	
Nature	Concentrations	D. F. P.	3318 CT
AcCh	0,01 M	$1,3 \cdot 10^{-5}$	$3 \cdot 10^{-7}$
PrCh	0,01 M	$1,1 \cdot 10^{-5}$	$7 \cdot 10^{-6}$
AcThCh	0,01 M	$3 \cdot 10^{-5}$	$2 \cdot 10^{-6}$
BuCh	0,03 M	$3 \cdot 10^{-9}$	$3 \cdot 10^{-4}$
BuThCh	0,01 M	$6 \cdot 10^{-9}$	$2 \cdot 10^{-3}$

thioestérases, résistantes à l'action du D. F. P. Cependant, nous avons observé que, pour l'acétylthiocholine et la butyrylthiocholine, les dégagements de CO_2 qui ne sont pas supprimés par les fortes doses de D. F. P., dans les conditions normales d'expérimentation (pH 7,4), sont par contre réduits à pH acide (environ 6). Ce phénomène plaide en faveur de l'explication que donnent AUGUSTINSSON et ISACHSEN (1957) des dégagements importants obtenus, dans les conditions manométriques, avec les esters de la thiocholine et qu'ils attribuent au caractère acide de la thiocholine libérée.

Rien ne permet, à partir de nos résultats, de choisir entre les deux hypothèses : de l'intervention, en plus des cholinestérases, de thioestérases, ou de l'interférence dans les conditions manométriques de l'acidité de la thiocholine libérée, mais les arguments en faveur de la seconde sont plus probants.

En résumé, nous avons montré, par l'étude biochimique du rectus de Grenouille, que le système cholinestérasique de ce muscle est représenté par deux enzymes de spécificité différente : une acétylcholinestérase et une butyrylcholinestérase. L'activité butyrylcholinestérasique des broyats est trois fois inférieure à leur activité acétylcholinestérasique.

La participation des deux enzymes dans l'hydrolyse des esters de la choline et de la thiocholine est relevée dans le tableau IV.

TABLEAU IV

INTERVENTIONS DE L'ACÉTYLCHOLINESTÉRASE
ET DE LA BUTYRYLCHOLINESTÉRASE DU RECTUS DE GRENOUILLE
DANS L'HYDROLYSE DES ESTERS DE CHOLINE ET DE THIOCHOLINE

Esters	Hydrolyse (en %) assurée par les cholinestérases		Hydrolyse résiduelle non inhibée par les anticholinestérases (en %)
	AChE	BuChE	
ACh	95-100	(5) *	—
PrCh	70	30	—
AcThCh	70	15	15
BuCh	0	100	—
BuThCh	0	70	30

Les pourcentages sont calculés à partir de l'hydrolyse totale des esters.
(*) Valeur dans la limite des erreurs expérimentales.

L'acétylthiocholine est hydrolysée par les deux types de cholinestérases, mais la butyrylcholinestérase n'intervient que pour 15 % de son hydrolyse. La butyrylthiocholine est hydrolysée spécifiquement par la butyrylcholinestérase. Toutefois, pour ces deux esters, une proportion importante des dégagements (15 % pour l'acétylthiocholine et 30 % pour la butyrylthiocholine) n'est pas attribuable aux cholinestérases. Elle résulte soit de l'intervention de thioestérases, soit de l'interférence d'un processus non enzymatique dû à l'acidité de la thiocholine libérée.

B. — ÉTUDE PHARMACOLOGIQUE

MÉTHODE

1° PRÉPARATION DU MUSCLE. — Après dissection, le muscle est mis en place dans le bain et laissé au repos pendant 2 heures avant le début de l'expérience proprement dite. La capacité du bain est de 25 ml; sa température, celle du laboratoire. Nous avons utilisé un liquide de composition suivante :

Chlorure de sodium	1	g
Chlorure de potassium	0,2	g
Chlorure de calcium 4 H ₂ O	0,2	g
Bicarbonate de sodium	0,03	g
pour 1 litre d'eau.		

L'oxygénation est assurée par de l'air comprimé. Les contractions sont enregistrées avec un levier isotonique à inscription frontale (rapport d'amplification : 4,8).

Les solutions de substances stimulantes (chlorures d'acétylcholine, de butyrylcholine, de propionylcholine, de choline, et iodure d'amyltriméthylammonium) sont préparées extemporanément à partir de solutions à 10 mg/ml conservées au maximum pendant 8 jours à la chambre froide.

Ces substances sont laissées au contact du muscle jusqu'au maximum de la contraction, atteint, suivant les cas, en 3 à 5 minutes. Le muscle est ensuite abondamment lavé pendant 30 secondes par un système à trop-plein; un contrepoids de 2 g est appliqué à l'extrémité du levier pendant 30 secondes pour accélérer le relâchement du muscle dont la contraction soutenue est du type contracture. Le muscle est laissé au repos pendant 15 minutes avant l'addition d'une nouvelle dose. Cet horaire est strictement observé pour limiter les variations résultant de récupérations variables.

2° COMPARAISON DES ACTIVITÉS. — Comme l'a signalé MAANEN en 1950, nous avons observé une grande variabilité individuelle de sensibilité aux substances contracturantes. Pour limiter au maximum l'interférence de ces variations, les actions stimulantes ont été comparées de deux façons :

- *Sur un même rectus.* — On recherche tout d'abord la sensibilité de la préparation à l'acétylcholine, puis on alterne régulièrement la substance étudiée et l'acétylcholine jusqu'à ce qu'un effet moyen de la première — environ 50 % de l'effet maximal — soit encadré par les effets de deux doses très proches d'acétylcholine.

Les activités relatives sont calculées par interpolation. Elles sont exprimées par le rapport de la concentration moléculaire d'acétylcholine sur celle de la substance étudiée.

— *Sur des rectus différents.* — On établit la courbe complète des effets en fonction des doses, en exprimant l'effet en pourcentage de la contraction maximale. Une courbe moyenne est établie pour chaque ester à partir de plusieurs courbes réalisées sur des rectus différents. Cette courbe est caractérisée, en plus de sa position — qui correspond aux activités —, par la pente de sa portion moyenne, qui traduit la progression de l'effet.

3° EFFETS DES ANTICHOLINESTÉRASIQUES. — Les anticholinestérasiques sont directement introduits dans les bains où plongent les muscles. La modification de la sensibilité est mesurée après un temps de 30 minutes de contact sans lavage préalable. Les effets quantitatifs des différents anticholinestérasiques ont été déterminés d'abord de façon approximative par le rapport des amplitudes obtenues, avec une même dose de l'agent contracturant, avant et après addition de l'inhibiteur (rapport R_A);

ensuite, de façon plus précise, par le rapport des doses de substances contracturantes qui donnent, avant et après traitement du muscle, un effet de même amplitude choisi aux environs de l'effet semi-maximal (rapport R_D). Ces rapports ont été établis de la façon suivante :

a) *Rapport R_A* . — Dans le cas le plus fréquent d'une potentialisation, on choisit une dose de la substance contracturante provoquant, avant sensibilisation, une contracture de faible amplitude (environ 10 % de l'effet maximal). Dans le cas d'un effet dépresseur, l'amplitude témoin est choisie dans la zone sous-maximale des courbes doses/action des substances contracturantes. Les amplitudes comparées se trouvent ainsi l'une et l'autre dans une partie de la courbe où l'effet peut être considéré, en première approximation, comme proportionnel à la dose.

Ce rapport, d'obtention très facile, permet de fixer, dès le premier essai, la valeur approximative de la modification de la sensibilité, puisqu'il ne nécessite aucun tâtonnement dans le choix de la dose de la substance contracturante à administrer après l'addition de l'inhibiteur.

Il ne peut cependant donner de façon rigoureuse la valeur de la sensibilisation ou de la dépression : lorsque la potentialisation est importante, l'augmentation de l'amplitude est limitée par la valeur de la contraction maximale. D'autre part, l'effet n'est pas, en réalité, proportionnel à la dose. Le rapport est influencé par la différence des pentes des courbes doses/action avant et après administration de l'anticholinestérasique.

b) *Rapport R_D* . — Après traitement par l'anticholinestérasique, on recherche la dose de la substance étudiée dont l'effet d'amplitude semi-maximale est compris entre deux réponses voisines du muscle normal. La valeur de la sensibilisation est calculée par le rapport des doses qui donnent le même effet avant et après traitement du muscle.

Le rapport R_D est une expression théorique plus satisfaisante de la sensibilisation que le rapport R_A , puisqu'il n'est pas sujet à l'erreur résultant du caractère maximal de certaines contractures. Il n'est établi cependant que pour un point singulier de la courbe (50 % maximal), et il n'exprime pas les éventuelles modifications des pentes des courbes doses/action résultant du traitement par l'inhibiteur.

4° EXPÉRIENCES D'ASSOCIATION DE DEUX INHIBITEURS. — Le premier inhibiteur est dilué dans le liquide du réservoir, sauf s'il s'agit du D. F. P., qui est introduit directement dans le bain. L'effet est déterminé, après un temps de contact de 30 minutes, par le rapport des doses (R_D). Le muscle est lavé abondamment avec le liquide contenant le premier inhibiteur et le second est introduit directement dans le bain. Après un temps de contact de 30 minutes, les modifications complémentaires de sensibilité du muscle sont calculées par le rapport des amplitudes (R_A).

RÉSULTATS

1° Comparaison de l'activité contracturante des esters de la choline et de l'amyltriméthylammonium.

Les contractures du rectus de Grenouille engendrées par les esters de la choline ont la même allure : elles progressent rapidement au début, plus lentement ensuite et atteignent enfin un plateau net (fig. 4). La contracture par l'amyltriméthylammonium est différente : elle est lente d'emblée et le maximum est moins distinct (fig. 4).

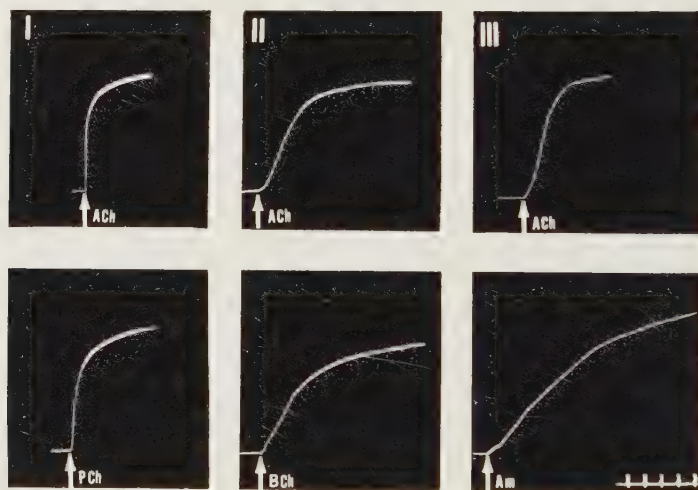


FIG. 4. — Rectus de Grenouille. Comparaisons des effets de la propionylcholine, de la butyrylcholine et de l'amyltriméthylammonium aux effets de l'acétylcholine.

En haut, réponses à l'acétylcholine. Variations individuelles de la vitesse de la contracture.

En bas, successivement, réponses des muscles correspondant à la propionylcholine, butyrylcholine, amyltriméthylammonium.

Temps en 30 secondes.

Les activités contracturantes relatives moyennes sont relevées dans le tableau V. La butyrylcholine et la propionylcholine sont nettement plus actives que l'acétylcholine : respectivement 2,9 et 1,44 fois. L'activité de l'amyltriméthylammonium est nettement inférieure (rapport moyen : 0,39).

Nos résultats diffèrent de ceux de CHANG et GADDUM (1933) (1) qui ont

(1) Ceci n'est pas dû aux sels que nous utilisons, mais sans doute à une sensibilité différente des préparations. En effet, les rapports d'activité que nous avons obtenus sur l'intestin isolé de lapin — respectivement de 1/45 pour la propionylcholine et de 1/160 pour la butyrylcholine — sont très semblables à ceux publiés par CHANG et GADDUM (1933).

obtenu un rapport d'activité voisin de 1 pour la butyrylcholine, de 5,5 pour la propionylcholine, mais concordent pour la butyrylcholine avec les données plus récentes de COHEN, WARRINGA et BOVENS (1951).

La progression des effets en fonction de la dose, exprimée par la *pente de la partie moyenne des courbes représentatives* (fig. 5), est voisine pour les esters de la choline, plus rapide cependant pour les esters propionique et butyrique (P respectivement de 1,05 et 1) que pour l'ester acétique

TABLEAU V

ACTIVITÉ COMPARÉE DES ESTERS ACÉTIQUE, PROPIONIQUE ET BUTYRIQUE DE LA CHOLINE ET DE L'AMYLTRIMÉTHYL-AMMONIUM SUR LE RECTUS ISOLÉ DE GRENOUILLE.

(Activité de l'Ach = 1)

Preh	Buch	AmT
1,3	—	—
1,8	2,3	0,54
1,76	5	0,45
1,4	2,3	—
1,07	2,6	—
1,1	2,1	—
1,7	3,4	—
1,4	2,6	0,18
<i>Moyennes :</i>		
1,44	2,9	0,39

($P = 0,86$). Une variabilité assez grande est observée dans la pente des courbes obtenues avec ce dernier ester.

La progression des effets est nettement plus rapide avec l'amytriméthylammonium ($P = 1,8$).

Discussion des résultats. — Diverses caractéristiques permettent de différencier nettement l'action stimulante de l'amytriméthylammonium d'une part, des esters de la choline d'autre part. L'amytriméthylammonium est nettement moins actif que les autres substances; contrairement aux contractions relativement rapides obtenues avec les esters de la choline, la contraction du rectus, sous l'effet de l'amytriméthylammonium, est lente à s'établir et son maximum peu distinct; enfin, la pente des courbes doses/action est nettement plus abrupte.

Ces différences peuvent être attribuées à différents facteurs. Le groupement cationique, ammonium quaternaire, commun aux quatre substances étudiées, permet de penser *a priori*, à la suite de KUFFLER (1943), FATT (1950), BURNS et PATON (1951), THESLEFF (1955 a), MILEDI (1959), que leur action dépolarisante s'exerce uniquement au niveau des jonctions neuro-

musculaires. Mais les observations faites par JARCHO et coll. (1950), THESLEFF (1955 *b*), OCHS et MUCKHERJEE (1959) d'une action dépolarisante du décarnéthonium et de la choline, portant sur toute la surface des fibres musculaires du sartorius et du diaphragme de Rat, du sartorius de Grenouille, suggèrent que l'allure particulière de la contraction par l'amytriméthylammonium et la pente abrupte de sa courbe doses/action pourrait résulter de la stimulation de récepteurs différents de ceux stimulés par les esters de la choline.

Il est probable, d'autre part, que les différences observées dans les

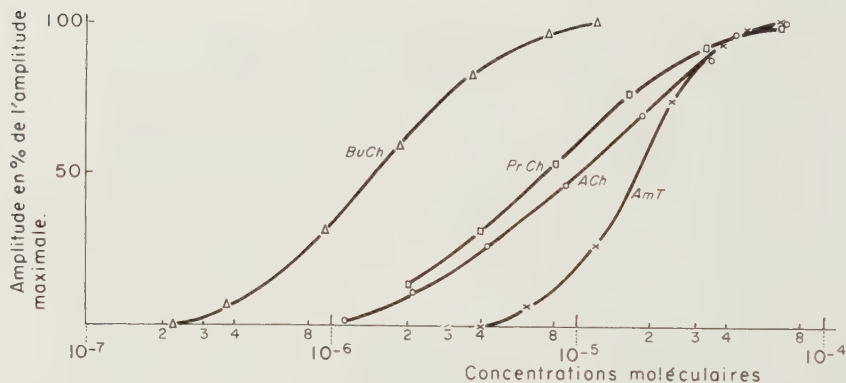


FIG. 5. — Rectus de Grenouille. Courbes doses/action des esters de la choline et de l'amytriméthylammonium.

En abscisses : concentrations moléculaires des substances contracturantes (échelle logarithmique).

En ordonnées : les effets sont calculés en pourcentage de la contraction maximale.

Les pentes des courbes doses/action résultent, au moins en partie, de l'hydrolyse enzymatique des esters de la choline : la pente de la courbe de l'amytriméthylammonium, substance non hydrolysable, est plus abrupte que celle des courbes obtenues avec les esters de la choline.

Cette hypothèse s'accorde avec les observations faites antérieurement par HOBBERG (1950). Cet auteur a montré que la pente de la courbe doses/action du chlorure de potassium est abrupte sur un rectus normal et qu'elle varie peu lorsque le muscle est traité par un anticholinestérasique. Par contre, celle de l'acétylcholine, plus aplatie sur un muscle normal, présente une pente analogue à celle de la courbe du chlorure de potassium après inhibition des cholinestérases.

Les esters de la choline se différencient entre eux surtout par leur activité. En effet, les esters butyrique et propionique sont plus actifs sur le rectus que l'ester acétique. Les pentes des courbes doses/action sont

peu différentes, bien qu'en moyenne celles de la butyrylcholine et de la propionylcholine soient plus abruptes que celle de l'acétylcholine, pour laquelle nous observons des variations importantes. Cette variabilité est peut-être en relation avec les différences individuelles observées pour les activités cholinestérasiques dans la partie biochimique. Elle est plus apparente dans le cas de l'acétylcholine, ce qui correspondrait à la plus forte hydrolyse enzymatique de cet ester.

2° Effets des anticholinestérasiques.

POTENTIALISATIONS :

La *Néostigmine* (fig. 6) sensibilise le rectus de Grenouille aux trois esters de la choline à des concentrations comprises entre $0,1$ et $10 \mu\text{g/ml}$ ($3 \cdot 10^{-7}$ M et $3 \cdot 10^{-5}$ M). Aux concentrations supérieures, la *Néostigmine*

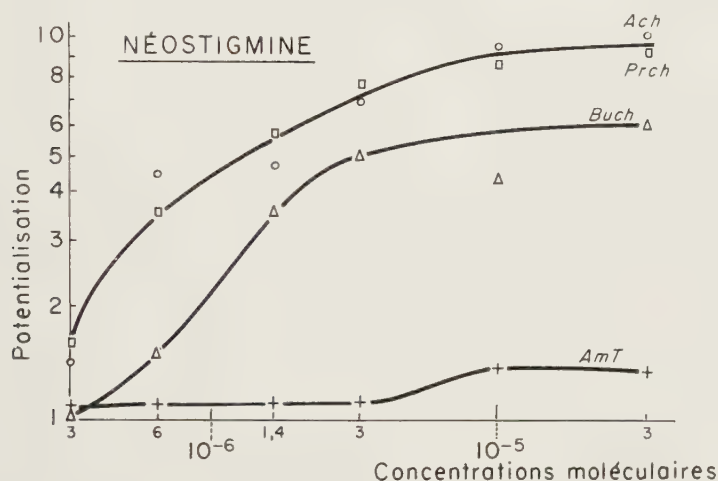


FIG. 6. — Potentialisation des esters de la choline et de l'amyltriméthylammonium par la *Néostigmine* (JACOB et DECHAVASSINE, 1955, modifiée).

En abscisses : concentrations moléculaires de *Néostigmine* (échelle logarithmique).

En ordonnées : potentialisation exprimée par le rapport des doses (R_D).

possède elle-même une action contracturante qui ne permet plus de mesurer la valeur des potentialisations. Une sensibilisation maximale aux trois esters de la choline est obtenue pour les concentrations de 1 à $3 \mu\text{g/ml}$ ($3 \cdot 10^{-6}$ M à $9 \cdot 10^{-6}$ M).

Les courbes de l'acétylcholine et de la propionylcholine sont confondues, avec un rapport maximum de potentialisation (R_D) de 10. Un rapport inférieur (voisin de 6) est obtenu pour la butyrylcholine. Il est néan-

moins très nettement supérieur à celui de l'amytriméthylammonium (R_D 1,3).

Le D. F. P. sensibilise très différemment la butyrylcholine d'une part, l'acétylcholine et la propionylcholine d'autre part, (fig. 7). Alors qu'une dose de 0,3 ng/ml ($1,6 \cdot 10^{-9}$ M) potentialise déjà l'action de la butyrylcholine, il faut élever la concentration à 3 μ g/ml ($1,6 \cdot 10^{-5}$ M) pour qu'une légère sensibilisation à l'acétylcholine et à la propionylcholine soit observée. La potentialisation de la butyrylcholine atteint son maxi-

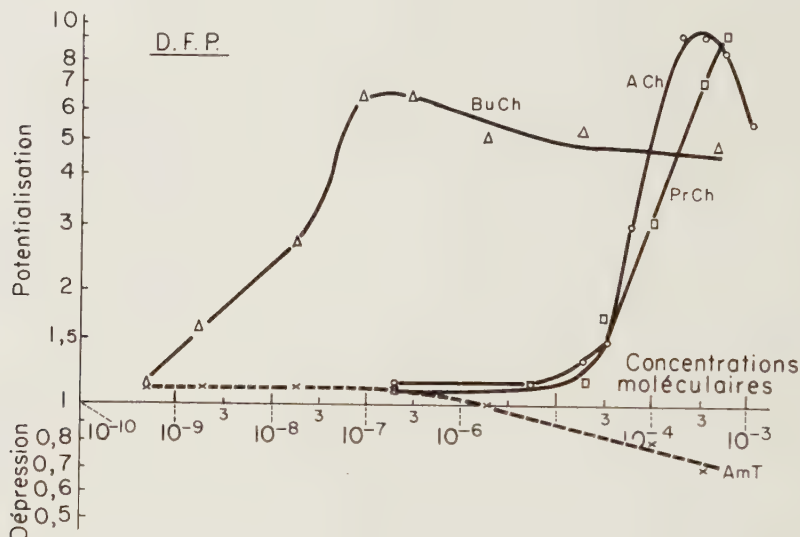


Fig. 7. — Actions du D. F. P. sur les réponses du rectus de Grenouille aux esters de la choline et à l'amytriméthylammonium.

En abscisses : concentrations moléculaires de D. F. P. (échelle logarithmique).

En ordonnées : potentialisation et dépression exprimées par le rapport des doses (R_D) (échelle logarithmique).

um dès la concentration de $1 \cdot 10^{-7}$ M. Celles de l'acétylcholine et de la propionylcholine progressent jusqu'aux concentrations comprises entre 30 et 100 μ g/ml ($1,6 \cdot 10^{-4}$ M et $5,4 \cdot 10^{-4}$ M); elles diminuent ensuite rapidement. Les potentialisations maximales de l'acétylcholine et de la propionylcholine sont là aussi supérieures à celle de la butyrylcholine, les rapports de doses respectifs étant à nouveau de 10 et de 6.

Aux concentrations de $1 \cdot 10^{-3}$ M et $2,7 \cdot 10^{-3}$ M, la potentialisation des trois esters de la choline est plus forte après lavage avec du liquide physiologique que pendant le contact avec l'anticholinestérasique (fig. 8). Il s'agit vraisemblablement de l'interférence d'une action dépressive existant lorsque le D. F. P. est en contact et qui disparaît par le lavage. En effet,

dès la concentration de $3 \cdot 10^{-5}$ M, le D.F.P. antagonise l'action de l'amytriméthylammonium. Une interprétation semblable de ce phénomène a été donnée par BACQ (1947).

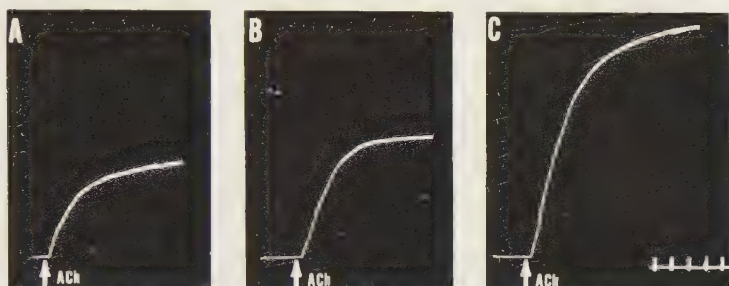


FIG. 8. — Rectus de Grenouille. Action du lavage sur la potentialisation de l'acétylcholine par le D. F. P.

↑ ACh, acétylcholine 0,2 μ g/ml.

En A, témoin; en B, après D. F. P., $2,7 \cdot 10^{-3}$ M; en C, après lavage.

Temps en 30 secondes.

3318 CT (fig. 9). — La potentialisation de l'acétylcholine par le 3318 CT débute aux concentrations comprises entre $1,3 \cdot 10^{-8}$ M et $1,3 \cdot 10^{-7}$ M, progresse lentement jusqu'à un rapport de doses de 1,6 à la concentration

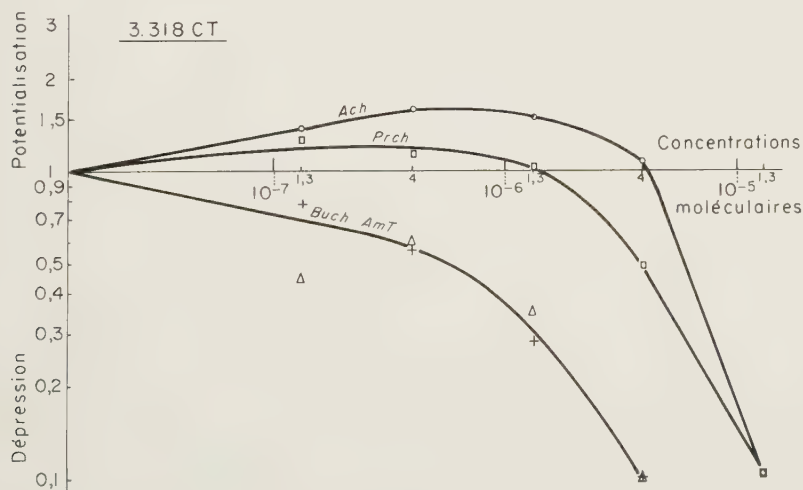


FIG. 9. — Actions du 3318 CT sur les réponses du rectus de Grenouille aux esters de la choline et à l'amytriméthylammonium (JACOB et DECHAVASSINE, 1955, modifiée).

En abscisses : concentrations moléculaires de 3318 CT (échelle logarithmique).

En ordonnées : potentialisation et dépression exprimées par le rapport des doses (R_D) (échelle logarithmique).

de 0,3 $\mu\text{g/ml}$ ($4 \cdot 10^{-7}$ M), puis diminue progressivement pour faire place à une dépression à la concentration de $4 \cdot 10^{-6}$ M.

La courbe représentative de la propionylcholine est semblable, mais le maximum de sensibilisation est plus faible encore ($R_D = 1,3$) et la dépression s'établit plus rapidement, dès la concentration de $1,3 \cdot 10^{-6}$ M.

Les effets de la butyrylcholine et de l'amytriméthylammonium sont déprimés pour toute la gamme des concentrations de 3318 CT utilisées. Leurs courbes sont confondues.

Le 3318 CT est donc surtout caractérisé par son effet dépresseur. Cet effet interfère vraisemblablement avec son effet sensibilisant pour l'acétylcholine et la propionylcholine, puisque les rapports de potentialisation sont très faibles et que, pour les doses supérieures, seule une dépression est mise en évidence. Pour isoler, de façon théorique, l'effet sensibilisant du 3318 CT, la potentialisation de l'acétylcholine et de la propionylcholine a été calculée en prenant comme axe des abscisses la courbe de dépression commune à la butyrylcholine et à l'amytriméthylammonium.

TABLEAU VI

EFFETS DU 3318 CT SUR LA SENSIBILITÉ DU RECTUS DE GRENOUILLE
AUX ESTERS DE LA CHOLINE ET A L'AMYLTRIMÉTHYLAMMONIUM

Concentrations moléculaires de 3318 CT	Amyltriméthyl- ammonium	Butyrylcholine		Acétylcholine		Propionylcholine	
	Effet observé	Effet observé (1)	Sensibi- lisation réelle (2)	Effet observé	Sensibi- lisation réelle	Effet observé	Sensibi- lisation réelle
$1,3 \cdot 10^{-8}$	1	1	1	1	1	1	1
$1,3 \cdot 10^{-7}$	0,78	0,45	1	1,35	1,9	1,27	1,8
$4 \cdot 10^{-7}$	0,56	0,58	1	1,6	2,8	1,15	2
$1,3 \cdot 10^{-6}$	0,35	0,28	1	1,49	4,6	1,04	3,2
$4 \cdot 10^{-6}$	0,1	0,1	1	1,09	10,9	0,5	5

(1) Les effets du 3318 CT (potentialisation et dépression) sont exprimés par les rapports de doses (R_D).

(2) Sensibilisation réelle = sensibilisation exprimée de façon mathématique (voir texte).

Dans ces conditions (tableau VI), la valeur numérique de la potentialisation de l'acétylcholine par le 3318 CT atteint un maximum de 10,9 pour la concentration de $4 \cdot 10^{-6}$ M, valeur voisine de celle obtenue avec la Néostigmine et le D.F.P. La sensibilisation calculée du rectus à la propionylcholine est par contre nettement inférieure, avec un rapport de 5.

ESSAIS D'ASSOCIATION DE DEUX ANTICHOLINESTÉRASIQUES :

MUSCLE PRÉTRAITÉ PAR LE 3318 CT. — a) *Action complémentaire de la Néostigmine* (tableau VII). — Après une dose de 3318 CT ($4 \cdot 10^{-6}$ M) potentialisant de façon maximale l'acétylcholine et la propionylcholine, la sensibilité du muscle à ces deux esters est peu modifiée par la Néo-

TABLEAU VII

ACTION DE LA NÉOSTIGMINE SUR LE RECTUS PRÉTRAITÉ PAR LE 3318 CT

Concentrations moléculaires de 3318 CT	Concentrations moléculaires de Néostigmine	Ach	Preh	BuCh	AmT
$4 \cdot 10^{-7}$ M	$3 \cdot 10^{-6}$ M	1,75	1,7	1,75	1,16
$4 \cdot 10^{-7}$ M	$1,5 \cdot 10^{-5}$ M	3,6	—	1,8	—
$4 \cdot 10^{-6}$ M	$3 \cdot 10^{-6}$ M	1,12	1,3	2,3	1,08

Les chiffres représentent les rapports (R_A) des amplitudes obtenues, pour une même dose d'agent contracturant, avant et après traitement par le deuxième anticholinestérasique.

stigmine. Il en est de même pour l'amyltriméthylammonium; seule l'activité de la butyrylcholine est nettement potentialisée. Après une concentration inférieure de 3318 CT, les trois esters de la choline sont potentialisées de façon égale.

b) *Action complémentaire du D. F. P.* (tableau VIII). — Après des concentrations de 3318 CT variant de $4 \cdot 10^{-7}$ M à $1,3 \cdot 10^{-5}$ M, le D. F. P., aux concentrations de $1,6$ et $2,7 \cdot 10^{-5}$ M, modifie peu l'action de l'acétyl-

TABLEAU VIII

ACTION DU D. F. P. SUR LE RECTUS PRÉTRAITÉ PAR LE 3318 CT

Concentrations moléculaires de 3318 CT	Concentrations moléculaires de D. F. P.	Ach	Preh	BuCh	AmT
$4 \cdot 10^{-7}$ M	$1,6$ et $2,7 \cdot 10^{-5}$	1,17	1,6	2,5	1,1
$4 \cdot 10^{-7}$ M	$5,4 \cdot 10^{-4}$	1,3	1,4	5	1
$1,3 \cdot 10^{-6}$ M	$1,6 \cdot 10^{-5}$	1,16	1,35	2,3	1,33
$4 \cdot 10^{-6}$ M	$2,7 \cdot 10^{-5}$	1,2	—	2,2	—
$4 \cdot 10^{-6}$ M	$5,4 \cdot 10^{-4}$	0,3	0,9	5	1
$1,3 \cdot 10^{-5}$ M	$2,7 \cdot 10^{-5}$	1,14	1,7	3,1	1
$1,3 \cdot 10^{-5}$ M	$5,4 \cdot 10^{-4}$	0,3	0,9	3	1

Les chiffres représentent les rapports (R_A) des amplitudes obtenues, pour une même dose d'agent contracturant, avant et après traitement par le deuxième anticholinestérasique.

choline ou la déprime aux fortes concentrations comme celle de l'amyltri-méthylammonium; il potentialise par contre, nettement l'action de la butyrylcholine; la potentialisation de la propionylcholine est intermédiaire entre celles des deux autres esters.

MUSCLE PRÉTRAITÉ PAR LA NÉOSTIGMINE. — *Action complémentaire du 3318 CT* (tableau IX). — Le 3318 CT n'exerce aucune sensibilisation complémentaire aux trois esters de la choline lorsque le muscle a été traité

TABLEAU IX

ACTION DU 3318 CT SUR LE RECTUS SENSIBILISÉ PAR LA NÉOSTIGMINE

Concentrations moléculaires de Néostigmine	Concentrations moléculaires de 3318 CT	Ach	Prch	BuCh	AmT
$3 \cdot 10^{-6}$ M	$4 \cdot 10^{-7}$	1	0,8	0,67	0,44
$3 \cdot 10^{-11}$ M	$4 \cdot 10^{-6}$	Inhibition totale.	Inhibition totale.	Inhibition totale.	Inhibition totale.
$3 \cdot 10^{-6}$ M	$4 \cdot 10^{-5}$	»	»	»	»

Les chiffres représentent les rapports (R_A) des amplitudes obtenues, pour une même dose d'agent contracturant, avant et après traitement par le deuxième anticholinestérasique.

au préalable par une dose de Néostigmine ($3 \cdot 10^{-6}$ M) qui potentialise de façon maximale les trois esters de la choline. Seule une dépression est observée, plus précoce pour la butyrylcholine et la propionylcholine que pour l'acétylcholine.

MUSCLE PRÉTRAITÉ PAR LE D. F. P. — *Action complémentaire du 3318 CT* (tableau X). — Après une dose de $2,7 \cdot 10^{-5}$ M de D. F. P. qui sensibilise de façon maximale la butyrylcholine, de façon liminaire l'acétylcholine

TABLEAU X

ACTION DU 3318 CT SUR LE RECTUS SENSIBILISÉ PAR LE D. F. P.

Concentrations moléculaires de D. F. P.	Concentrations moléculaires de 3318 CT	Ach	Prch	BuCh	AmT
$2,7 \cdot 10^{-5}$	$1,3 \cdot 10^{-6}$	1,4	1,2	0,25	0,01
$2,7 \cdot 10^{-5}$	$4 \cdot 10^{-6}$	0,8	0,38	0,03	0
$2,7 \cdot 10^{-4}$	$1,3 \cdot 10^{-6}$	0,79	0,44	0,09	0,22
$5,4 \cdot 10^{-4}$	$4 \cdot 10^{-6}$	0,36	0,28	0,18	0

Les chiffres représentent les rapports (R_A) des amplitudes obtenues, pour une même dose d'agent contracturant, avant et après traitement par le deuxième anticholinestérasique.

et la propionylcholine, le 3318 CT exerce la même action qu'utilisé seul: à la concentration de $1,3 \cdot 10^{-6}$ M, il potentialise l'acétylcholine et la propionylcholine, antagonise la butyrylcholine et l'amyltriméthylammonium. Aux concentrations supérieures, il déprime l'action des quatre substances.

Après $2,7$ et $5,4 \cdot 10^{-4}$ M de D. F. P., potentialisant de façon maximale tous les esters, le 3318 CT exerce seulement une action dépressive, croissant de l'acétylcholine à la butyrylcholine.

DISCUSSION

Les dosages biochimiques des extraits de rectus de Grenouille ont mis en évidence l'existence de deux enzymes dans ce muscle, une acétylcholinestérase, spécifique de l'acétylcholine, et une butyrylcholinestérase, spécifique de la butyrylcholine.

Ces enzymes sont capables d'hydrolyser dans un temps relativement court une fraction importante des doses actives sur le rectus isolé. En effet, si on calcule à partir des dégagements de CO_2 obtenus *in vitro* le temps qu'il faudrait à un rectus de 200 mg pour hydrolyser des doses actives moyennes d'acétylcholine (25 μg), de propionylcholine (20 μg) et de butyrylcholine (15 μg), en admettant théoriquement que ces substrats accèdent simultanément aux centres enzymatiques, on constate que la totalité de l'acétylcholine et une fraction importante de la propionylcholine et de la butyrylcholine peuvent être hydrolysées pendant le temps de la contraction. Il faut respectivement 2 minutes, 3 minutes et 3 minutes 30 secondes pour hydrolyser théoriquement les doses d'acétylcholine, de propionylcholine et de butyrylcholine (tableau XI).

TABLEAU XI

TEMPS THÉORIQUEMENT NÉCESSAIRES
A L'HYDROLYSE DE DOSES PHARMACOLOGIQUEMENT ACTIVES D'ESTERS DE LA CHOLINE
PAR LES ENZYMES DU RECTUS DE GRENOUILLE

Substrat hydrolysé par minute, 200 mg de muscle	Doses actives moyennes	Temps pour l'hydrolyse des doses actives
$1,73 \mu\text{l} = 1,73 \times 22,4 \cdot 10^{-6} \text{ mol.}$	Chlorure d'acétylcholine. $25 \mu\text{g} = 3,3 \times 22,4 \cdot 10^{-6} \text{ mol.}$	2 mn
$0,803 \mu\text{l} = 0,8 \times 22,4 \cdot 10^{-6} \text{ mol.}$	Chlorure de propionylcholine. $20 \mu\text{g} = 2,44 \times 22,4 \cdot 10^{-6} \text{ mol.}$	3 mn
$0,5 \mu\text{l} = 0,5 \times 22,4 \cdot 10^{-6} \text{ mol.}$	Chlorure de butyrylcholine. $15 \mu\text{g} = 1,7 \times 22,4 \cdot 10^{-6} \text{ mol.}$	3 mn 24 sec

Quatre arguments plaident en faveur de l'hydrolyse *in vivo* des esters de la choline :

1° l'action stimulante de ces substances sur le rectus isolé est potentialisée par les anticholinestérasiques, alors que celle d'une substance non hydrolysable, l'amyltriméthylammonium, n'est pas ou peu modifiée.

2° On observe *in vivo*, comme *in vitro*, des différences quantitatives entre les esters : l'acétylcholine, hydrolysée plus rapidement que la butyrylcholine par les broyats, est aussi plus potentialisée que l'ester butyrique par les divers anticholinestérasiques.

3° Les faibles doses de D. F. P., qui inhibent *in vitro* la butyrylcholinestérase, potentialisent *in vivo* la butyrylcholine. De même, les faibles doses de 3318 CT, qui inactivent *in vitro* l'acétylcholinestérase, potentialisent l'acétylcholine.

4° On n'observe pas de potentialisation complémentaire de l'acétylcholine et de la butyrylcholine lorsque leur enzyme spécifique est inhibé de façon maximale par l'inhibiteur sélectif.

La comparaison détaillée des concentrations d'anticholinestérasiques actives *in vitro* et *in vivo* montre toutefois un certain décalage entre l'inhibition liminaire des cholinestérases et les potentialisations liminaires.

Une potentialisation liminaire est observée à la concentration de $5 \cdot 10^{-7}$ M de Néostigmine, alors qu'à cette concentration, l'inhibition *in vitro* des hydrolyses est supérieure à 60 % pour les trois esters.

Une potentialisation nette de l'acétylcholine par le 3318 CT, à la concentration de $1 \cdot 10^{-7}$ M, correspond à une inhibition liminaire de 25 % de l'acétylcholinestérase.

Avec le D. F. P., les potentialisations débutent aux concentrations qui inhibent d'environ 30 % l'hydrolyse de la butyrylcholine et de plus de 50 % celles de l'acétylcholine et de la propionylcholine.

Il était normal de rechercher l'origine de ces décalages tout d'abord dans les conditions différentes de l'inhibition : dans les dosages biochimiques, l'inhibiteur est ajouté à des broyats de muscle; dans les conditions pharmacologiques, l'inhibition est réalisée sur le muscle entier où l'accessibilité des inhibiteurs aux enzymes est limitée.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons déterminé l'inhibition de l'hydrolyse de l'acétylcholine et de la butyrylcholine par le D. F. P. ajouté, non pas à des broyats mais à des muscles, et cela dans les conditions des essais pharmacologiques. Cet anticholinestérasique est le seul qui se prête à une telle étude grâce à son caractère irréversible.

D'une façon générale, les inhibitions réalisées ainsi *in vivo* sont inférieures à celles relevées *in vitro* (tableau XII). Ceci démontre que l'accessibilité de l'inhibiteur aux enzymes est effectivement plus limitée sur le muscle entier que dans les broyats.

Pour les concentrations de $1,6 \cdot 10^{-9}$ M à $1,6 \cdot 10^{-7}$ M, la potenti-

TABLEAU XII

RELATIONS ENTRE LES ACTIVITÉS INHIBITRICES ET LES POUVOIRS POTENTIALISATEURS DU D. F. P.

Concentrations moléculaires de D. F. P.	Butyrylcholine		Acétylcholine		Propionylcholine		Ammonium triméthyle
	Inhibition (en %)	Potentia- lisation (1)	Inhibition (en %)	Potentia- lisation (1)	Inhibition (en %)	Potentia- lisation (1)	
		(<i>in vitro</i>)		(<i>in vivo</i>) (2)		(<i>in vitro</i>)	
1,6 . 10 ⁻⁹	30	1,4	—	—	—	—	1
1,6 . 10 ⁻⁸	91	21	—	—	—	—	1
4,8 . 10 ⁻⁸	95	36	—	—	—	—	—
1,6 . 10 ⁻⁷	95	76	6	14,5	30	1,1	1,1
1,6 . 10 ⁻⁶	100	93	15	14,1	34	1,1	1,3
1,6 . 10 ⁻⁵	100	100	55	15	57	1,1	1,1
2,7 . 10 ⁻⁵	—	—	70	27	70	1,7	1
5,4 . 10 ⁻⁵	—	—	89	—	85	2	—
1,6 . 10 ⁻⁴	—	—	100	67,4	96	4,5	0,8
2,7 . 10 ⁻⁴	—	—	100	83	96	7	0,7
5,5 . 10 ⁻⁴	—	—	100	91	100	9,5	—

(1) Potentialisation exprimée par le rapport des doses.

(2) Inhibition réalisée dans les conditions de l'organe isolé.

(1) Potentialisation exprimée par le rapport des doses.

(2) Inhibition réalisée dans les conditions de l'organe isolé.

sation de la butyrylcholine progresse régulièrement, parallèlement à l'accroissement de l'inhibition (fig. 10). Il en est de même pour l'acétylcholine. La potentialisation débute aux concentrations de $1,6 \cdot 10^{-6}$ M et $1,6 \cdot 10^{-5}$ M, comme l'inhibition, et progresse jusqu'à la concentration de $1,6 \cdot 10^{-4}$ M (fig. 11). On remarque cependant que pour les deux esters, la valeur maximale de la potentialisation est atteinte avant que l'inhibition soit complète. Ce phénomène résulte vraisemblablement de l'effet dépresseur du D. F. P. (voir p. 368) qui masque la sensibilisation maximale.

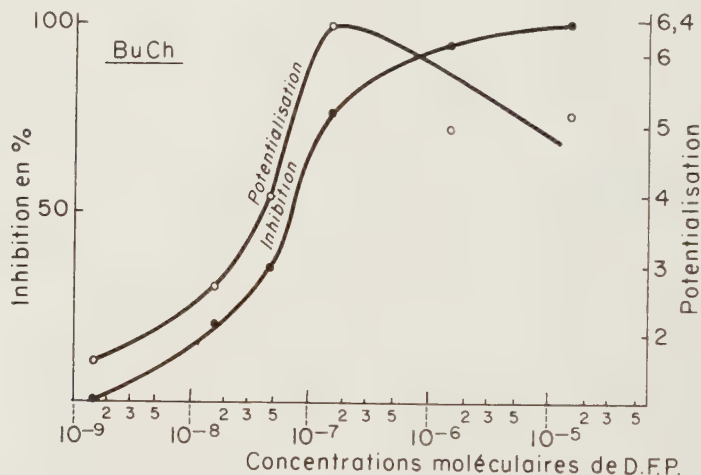


FIG. 10. — Rectus de Grenouille. Relations entre l'activité inhibitrice et le pouvoir potentialisateur du D.F.P. vis-à-vis de la butyrylcholine.

En abscisses : concentrations moléculaires de D. F. P. (échelle logarithmique).

En ordonnées : •—• Inhibition de l'hydrolyse de la butyrylcholine (en %). (L'inhibition est réalisée *in vivo* dans les conditions pharmacologiques.)

o—o Potentialisation des effets de la butyrylcholine. (Rapports de doses R_D .)

Il existe un décalage d'environ 10 % tantôt dans un sens, tantôt dans un autre. Nous estimons qu'il est dans la limite des erreurs expérimentales.

Il est donc permis de conclure que, dans la limite de la précision de notre technique, les cholinestérases du rectus de Grenouille interviennent, dans leur totalité, dans l'hydrolyse de l'acétylcholine et de la butyrylcholine en apport exogène et qu'une corrélation très étroite existe entre l'inhibition de l'acétylcholinestérase et la potentialisation de l'acétylcholine d'une part, l'inhibition de la butyrylcholinestérase et la potentialisation de la butyrylcholine d'autre part.

La corrélation des hydrolyses *in vitro* et *in vivo* est moins nette pour la propionylcholine. La potentialisation de cet ester suit celle de l'acétyl-

choline, alors qu'elle est hydrolysée *in vitro* par les deux cholinestérases. Seules les expériences d'association d'inhibiteurs mettent en évidence le caractère mixte de sa potentialisation : lorsque l'acétylcholinestérase a été complètement inhibée, l'action de la propionylcholine est en effet accrue par inhibition de la butyrylcholinestérase.

Il est intéressant de remarquer que cet ester est le seul des trois esters étudiés qui est hydrolysé par les deux cholinestérases du rectus de Grenouille. Il faut aussi souligner que cet ester est le plus actif sur

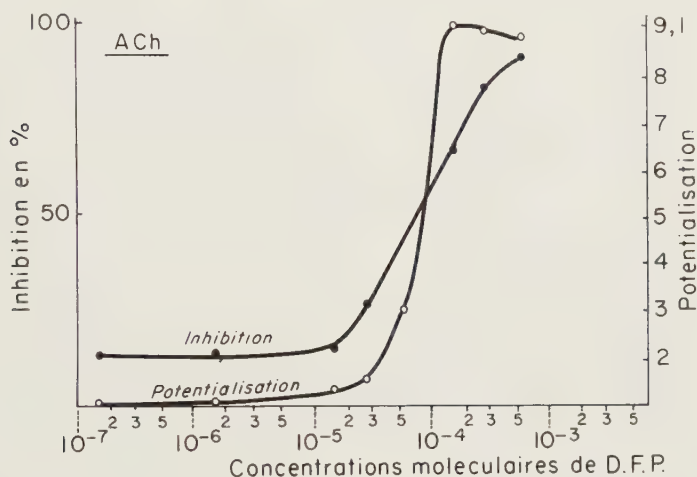


FIG. 11. — Rectus de Grenouille. Relations entre l'activité inhibitrice et le pouvoir potentialisateur du D. F. P. vis-à-vis de l'acétylcholine.

En abscisses : concentrations moléculaires de D. F. P. (échelle logarithmique).

En ordonnées : ●—● Inhibition de l'hydrolyse de l'acétylcholine (en %). (L'inhibition est réalisée *in vivo* dans les conditions pharmacologiques.)

○—○ Potentialisation des effets de l'acétylcholine. (Rapports de doses.)

l'organe isolé lorsque la totalité des cholinestérases a été inhibée (tableau XIII).

Ainsi, notre travail montre que les potentialisations des esters de la choline par les anticholinestérasiques résultent essentiellement de l'inhibition des cholinestérases, il montre aussi qu'un mécanisme de sensibilisation peut être indépendant de l'inhibition des cholinestérases, mais qu'il est très secondaire puisque les plus forts indices de potentialisation (rapports R_D) obtenus avec les substances non hydrolysables, l'amyli-méthylammonium et la choline, n'ont jamais été supérieurs à 1,5 (fig. 12 et 13). Ils correspondent ainsi seulement au quart et au septième des rapports maximaux obtenus respectivement avec la butyrylcholine et l'acétylcholine.

TABLEAU XIII

ACTIVITÉ COMPARÉE DES ESTERS ACÉTIQUE, PROPIONIQUE ET BUTYRIQUE DE LA CHOLINE ET DE L'AMYLTRIMÉTHYLAMMONIUM SUR LE RECTUS DE GRENOUILLE NORMAL ET TRAITÉ PAR LES ANTICHOLINESTÉRASIQUES.

Rectus	Inhibiteur	PrCh	BuCh	Amt
Normal.		1,44	2,9	0,39
Traité.	Néostigmine $3 \cdot 10^{-5}$ M	1,1	1	—
	D. F. P. $5,4 \cdot 10^{-4}$ M	1,13	0,75	0,009

Activité de l'acétylcholine : 1.
Les concentrations de Néostigmine et de D. F. P. inhibent *in vitro* de façon maximale les deux types de cholinestérases.

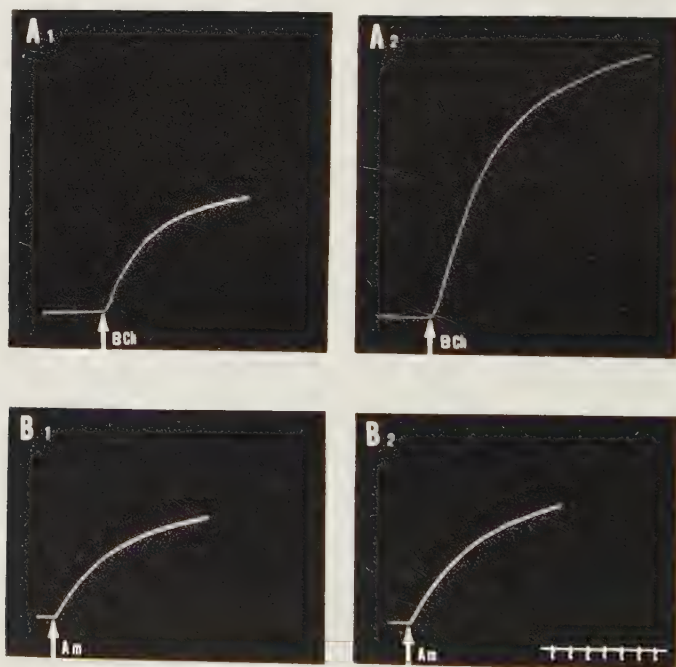


FIG. 12. — Rectus de Grenouille. Action du D. F. P. sur la sensibilité à la butyrylcholine et à l'amytriméthyl-ammonium.

En haut, $\uparrow$ BCh, butyrylcholine $0,4 \mu\text{g/ml}$:

en A₁, témoin; en A₂, après $1,6 \cdot 10^{-7}$ M de D. F. P.

En bas, $\uparrow$ Am, amytriméthylammonium $4 \mu\text{g/ml}$:

en B₁, témoin; en B₂, après $1,6 \cdot 10^{-7}$ M de D. F. P.

Temps en 30 secondes.

De nombreux auteurs ont signalé des sensibilisations semblables du rectus de Grenouille : O. MIQUEL (1946) avait observé une potentialisation complémentaire de ce muscle à l'acétylcholine par l'ésérine, après inhibition des cholinestérases par le D. F. P. Il l'avait attribuée à une action non enzymatique. Cette interprétation est cependant discutable, car la concentration de D. F. P. ($30 \mu\text{g/ml}$) utilisée par cet auteur est, dans nos essais, insuffisante pour inhiber totalement les cholinestérases.

Les résultats de ZAIMIS (1951) sont plus probants; cet auteur a observé une potentialisation par le T. E. P. P. de l'action stimulante du décacé-

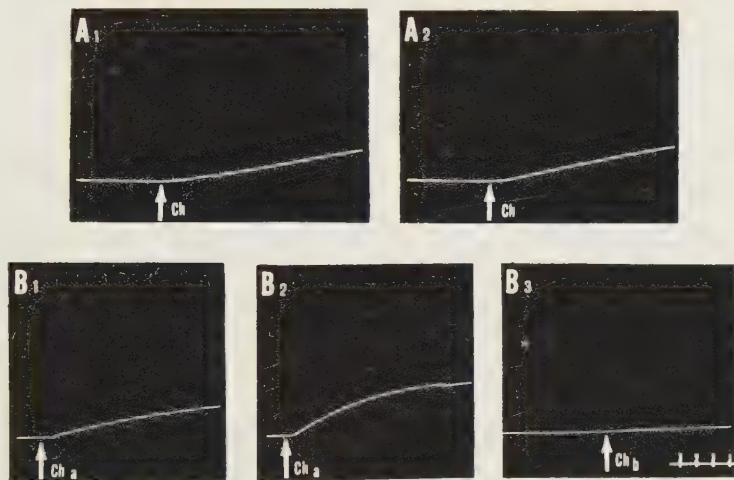


FIG. 13. — Rectus de Grenouille. Action du D. F. P. sur la sensibilité à la choline.

En haut : $\uparrow$ Ch, choline $200 \mu\text{g/ml}$:

A₁ : témoin.

A₂ : après D. F. P. $5,4 \cdot 10^{-6}$ M.

En bas :

B₁ : choline $200 \mu\text{g/ml}$.

B₂ : choline $200 \mu\text{g/ml}$ après $5,4 \cdot 10^{-4}$ M de D. F. P.

B₃ : choline $100 \mu\text{g/ml}$ après $5,4 \cdot 10^{-4}$ M de D. F. P.

Temps en 30 secondes.

thonium sur le rectus de Grenouille; COHEN et POSTHUMUS (1955), COHEN, WARRINGA et INDORFF (1955) ont montré que le D. F. P. provoque, en plus d'effets potentialisateurs tributaires d'une inhibition enzymatique irréversible, une sensibilisation qui s'en distingue par sa réversibilité au lavage.

Ces sensibilisations, indépendantes de l'inhibition des cholinestérases, ne sont pas propres au rectus : ZAIMIS (1951), HUTTER (1952) ont observé aussi ce phénomène sur la préparation nerf-muscle du tibial antérieur du Chat, VAN DER MEER et MEETER (1956 *a* et *b*), COHEN et POSTHUMUS (1957) sur celle du nerf phrénique - diaphragme du Rat.

COHEN et coll. ont émis l'hypothèse de l'existence de deux groupements B et A au niveau du récepteur musculaire : le groupement B étant le groupement estérasique où se ferait la combinaison directe du D. F. P. avec l'enzyme. Cette réaction pourrait provoquer la sensibilisation du groupement A qui est le lieu d'action anionique des effecteurs. FLEISHER et coll. (1960), sans rejeter l'existence de deux groupements, ont montré qu'ils sont indépendants, puisqu'en saturant le groupe B avec le D. F. P., une sensibilisation est encore possible en agissant sur le groupe A. D'après ces auteurs, le mécanisme de sensibilisation serait dû à une dépolarisation sous-liminaire sous l'effet du transmetteur endogène non hydrolysé.

Rien ne nous permet d'opter en faveur de l'une ou l'autre interprétation : la faible amplitude du phénomène en rend l'étude aléatoire.

En résumé, notre travail a mené aux mêmes conclusions que celles de SMITH, COHEN, PELIKAN et UNNA (1952) et que COHEN et POSTHUMUS (1955) en ce qui concerne la potentialisation de l'acétylcholine : elle est due à l'inhibition de l'acétylcholinestérase.

Nous avons apporté des précisions en ce qui concerne l'hydrolyse de la butyrylcholine : une butyrylcholinestérase dont l'activité représente environ 33 % de l'activité de l'acétylcholinestérase hydrolyse cet ester *in vitro* et *in vivo*. L'essentiel de sa potentialisation par les divers anticholinestérasiques doit être attribué à l'inhibition de cette hydrolyse enzymatique.

L'acétylcholinestérase et la butyrylcholinestérase interviennent en totalité dans l'hydrolyse de l'acétylcholine et de la butyrylcholine en apport exogène. Rien ne permet de penser qu'il en est de même dans les conditions réelles de la transmission neuromusculaire, pour l'hydrolyse du transmetteur endogène. Les récentes expériences de KRAATZ (1960) montrent que des contractions spontanées n'apparaissent que lorsque la totalité de la butyrylcholinestérase et 90 % de l'acétylcholinestérase sont inhibés par le T. E. P. P. Cet auteur les interprète en disant que ces enzymes ou fraction d'enzyme n'interviennent pas. En réalité, il nous semble que ces enzymes pourraient intervenir, tel un système de sécurité, pour empêcher que des libérations continues du transmetteur n'entraînent des phénomènes moteurs.

C. — LOCALISATION DES CHOLINESTÉRASES DANS LE RECTUS DE GRENOUILLE

L'examen microscopique du rectus de Grenouille met en évidence deux types de fibres.

Les fibres « lentes » sont peu nombreuses. Elles sont localisées directement sous l'aponévrose supérieure. Elles sont reconnaissables à leur

calibre faible et, surtout, à leurs insertions très digitées, reliées par un long pédicule de fibrilles collagènes à la ligne médiane d'insertions de la majorité des autres fibres. Leur faible teneur en inclusions lipidiques (COUTEAUX, 1956) les différencie nettement. Les fibres « rapides », larges, sont beaucoup plus nombreuses et constituent la totalité des fibres sous l'aponévrose inférieure.

Les fibres musculaires « rapides » sont innervées par des fibres nerveuses de gros calibre se terminant en une très grande arborisation (Buisson de Kühne), avec des branches rectilignes parallèles à l'axe longitudinal des fibres. Ces buissons peuvent mesurer quelques centaines de microns. Les rameaux de l'arborisation terminale sont logés à l'intérieur de gouttières dites « synaptiques » de faible courbure, constituées de replis de la membrane sarcoplasmique (appareil sous-neural de COUTEAUX, 1944-1947).

Les fibres musculaires « lentes » sont innervées par des fibres nerveuses myélinisées de petit calibre, se terminant en boutons à différents niveaux de la même fibre, quelquefois à de très petits intervalles (COUTEAUX, 1952).

Nous avons tout d'abord étudié par la méthode biochimique de WARBURG-AMMON dans quelle mesure la constitution du mélange cholinestérasique de la portion médiane des myomères — où sont localisées les jonctions neuro-musculaires de la plupart des fibres (fig. 15) — diffère de celle de la portion tendineuse de ces myomères.

La présence de jonctions neuro-musculaires près des myoseptes a été observée dans quelques fibres. Leur nombre ne représente cependant que moins de 10 % de l'ensemble des fibres. Il est donc possible d'admettre que l'activité cholinestérasique dosée dans la portion tendineuse est due en prédominance à l'activité aneurale tendineuse.

Nous avons ensuite recherché par la méthode histochimique de KÆLLE et FRIEDENWALD la localisation précise de l'acétylcholinestérase et de la butyrylcholinestérase aux différents niveaux des fibres musculaires rapides et lentes.

1° ÉTUDE DE LA RÉPARTITION PAR LA MÉTHODE BIOCHIMIQUE

Cette étude est réalisée sur des broyats de deux portions de muscle; la portion tendineuse est séparée de la portion médiane des myomères qui contient la majorité des jonctions neuro-musculaires.

La composition du mélange cholinestérasique dans ces deux portions musculaires est recherchée de deux façons :

— Nous déterminons, d'une part, l'activité butyrylcholinestérasique rapportée à l'activité acétylcholinestérasique en établissant le rapport des hydrolyses de l'acétylcholine et de la butyrylcholine par les deux portions.

— Nous évaluons, d'autre part, l'activité butyrylcholinestérasique par rapport à l'activité cholinestérasique totale en comparant, pour les deux préparations musculaires, l'inhibition de l'hydrolyse de la propionylcholine par les faibles doses de D. F. P., sélectives de la butyrylcholinestérase. En effet, nous avons vu dans la partie biochimique que l'hydrolyse mixte de cet ester par l'acétylcholinestérase et la butyrylcholinestérase se traduit par un palier sur la courbe d'inhibition par le D. F. P., aux concentrations de $1 \cdot 10^{-8}$ M à $1 \cdot 10^{-7}$ M de D. F. P. L'inhibition réalisée à ce niveau est d'autant plus grande que l'activité butyrylcholinestérasique du mélange enzymatique est plus importante.

TECHNIQUE. — Les broyats des deux portions musculaires sont faits comme précédemment. Leur concentration terminale est semblable (1/15), sauf pour la portion neurale dans le paragraphe b où elle est de 1/22,5. Les conditions expérimentales de la technique manométrique de WARBURG-AMMON (tampon, concentrations) sont les mêmes que précédemment.

a) *Hydrolyse relative de la butyrylcholine par les portions neurale et tendineuse.* — L'hydrolyse de la butyrylcholine est relativement plus importante dans la portion tendineuse que dans la portion neurale

TABLEAU XIV
HYDROLYSE RELATIVE DE LA BUTYRYLCHOLINE
PAR LES PORTIONS NEURALE ET TENDINEUSE DU RECTUS DE GRENOUILLE

Expériences	Portion tendineuse		Portion neurale		Muscle entier	
	ACh	BuCh	ACh	BuCh	ACh	BuCh
1	136,3	50,2	196	56,1	281,6	94
2	116	44,2	223,4	57,1	138	52,2
3	139,3	46,3	235,6	59,9	226,6	75,8
Somme des dégagements.	391,6	140,7	655	173,1	646,2	222
Hydrolyse relative de la BuCh en %	36 %		26,5 %		34 %	

Dégagement de CO² en µl pour 0,2 g de muscle pour 120 minutes.
ACh : 0,01 M; BuCh : 0.03 M.

(tableau XIV). Dans le premier cas, elle représente 36 % de l'hydrolyse de l'acétylcholine, dans le second 28 %. Une valeur intermédiaire (34 %) est obtenue pour le muscle entier.

b) *Inhibition par le D. F. P. de l'hydrolyse de la propionylcholine par les portions neurale et tendineuse du rectus de Grenouille.* — Malgré la

dilution plus importante de la portion neurale, l'hydrolyse de la propionylcholine demeure plus importante que dans la portion tendineuse. On peut admettre cependant que la valeur des inhibitions n'est pas influencée par la concentration des enzymes, en raison de leur très forte dilution (NACHMANSOHN, ROTHENBERG et FELD, 1948).

Les inhibitions obtenues sont relevées dans le tableau XV et transcrites sur la courbe (fig. 14).

TABLEAU XV

INHIBITION PAR LE D. F. P. DE L'HYDROLYSE DE LA PROPIONYLCHOLINE
PAR LES PORTIONS NEURALES ET TENDINEUSES DU RECTUS DE GRENOUILLE

Concentrations moléculaires de D. F. P.	1. 10 ⁻⁹		1. 10 ⁻⁸		1. 10 ⁻⁷		1. 10 ⁻⁶		1. 10 ⁻⁵		1. 10 ⁻⁴	
Jonctions neuro-muscu- laires (N) et musculo- tendineuses (T).	N	T	N	T	N	T	N	T	N	T	N	T
Moyenne des inhibitions en %.	13,6	10,4	27,3	41,3	25,9	45,8	24,9	50,7	48,7	68,5	91,7	96,6
n	2	1	5	5	6	6	2	2	2	2	2	2
Δs			7,5	12,36	4,89	9,38						
Es			3,37	5,57	1,99	3,82						
t = (*)			2,15		4,18							

(N) : jonctions neuro-musculaires (dilution 1/22,5 = 0,133 de muscle).
(T) : jonctions musculo-tendineuses (dilution 1/15 = 0,200 g de muscle).
(*) : t de Student calculé suivant la formule $\frac{d}{sd}$.
d : différence entre les moyennes; sd : erreur standard de d.

Aux concentrations de 1. 10⁻⁸ M et 1. 10⁻⁷ M de D. F. P., spécifiques de la butyrylcholinestérase, l'inhibition plafonne pour un pourcentage d'environ 26 % pour la portion neurale, de 43 % pour la portion tendineuse. Les écarts entre les moyennes obtenues pour les deux portions à la concentration de 1. 10⁻⁷ M sont significatifs pour P = 0,01. (La valeur de t = 4,18 est en effet supérieure à sa valeur limite calculée pour une probabilité de 1/100, avec 10 degrés de liberté.)

Ces pourcentages mettent en valeur la différence existant dans le

mélange cholinestérasique des deux préparations : l'activité butyrylcholinestérasique représente environ 26 % de l'activité cholinestérasique globale de la portion neurale et 43 % de celle de la portion tendineuse.

On constate ainsi une concordance générale entre les résultats obtenus par les deux procédés biochimiques; l'activité de la butyrylcholinestérase est plus importante dans les régions aneurales tendineuses que dans les régions neurales.

On constate cependant quelques divergences de détail. Les valeurs

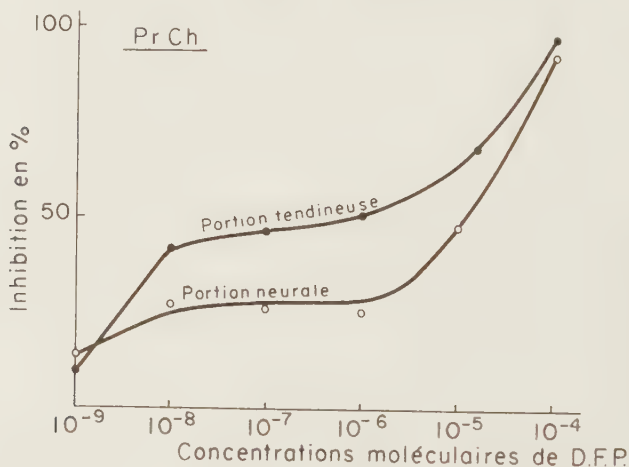


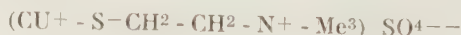
FIG. 14. — Inhibition par le D. F. P. de l'hydrolyse de la propionylcholine par les portions neurale et tendineuse du rectus de Grenouille.

En abscisses : concentrations moléculaires de D. F. P. (échelle logarithmique).
En ordonnées : inhibition (en %).

concernant les activités relatives de la butyrylcholinestérase par rapport à l'acétylcholinestérase obtenues par le premier test ne sont en effet non pas plus petites mais plus grandes que celles concernant les activités de la butyrylcholinestérase rapportées à l'activité cholinestérasique totale, obtenues par le deuxième test. Les écarts sont explicables par les erreurs cumulées dans les rapports.

2° LOCALISATION PAR LA MÉTHODE HISTOCHIMIQUE

La méthode de KOELLE et FRIEDENWALD (1949) est basée sur l'hydrolyse d'esters carboxyliques de la thiocholine en présence d'un complexe cuivrique, le glycoollate de cuivre. Le sulfate de thiocholine libéré est précipité comme mercaptan cuivrique dont la structure est, suivant MALMGREN et SYLVEN (1955) :



Finalement, le précipité de thiocholine de cuivre est converti en sulfure de cuivre au niveau même de la réaction par traitement avec du sulfure d'ammonium.

Nous avons utilisé cette méthode avec les modifications apportées par COUTEAUX et TAXI (1951 et 1952 *b*), COUTEAUX, 1951, en vue de limiter les artefacts dus à la diffusion des produits d'hydrolyse; ces modifications concernent notamment le choix du pH et du tampon d'incubation.

Les expériences ont été réalisées sur le muscle frais entier ou, plus généralement, sur coupes de muscle fixé *in situ* pendant 30 minutes dans du formol neutralisé à 10 %. Les coupes ont été faites au microtome à congélation; leur épaisseur a été de 30 à 35 μ .

En raison de la rareté des fibres lentes dans les coupes de rectus de Grenouille, nous avons étudié aussi les faisceaux de fibres lentes du gastrocnémien, situées en surface dans les régions latérales supérieures. Le gastrocnémien est fixé, *in situ*, en extension dans du formol neutralisé à 10 %.

Les coupes de rectus et les préparations de muscle entier de gastrocnémien sont incubées avec les substrats dans un tampon acide acétique-acétate de sodium à pH 5,5, à la température du laboratoire.

L'utilisation de l'acétylthiocholine et de la butyrylthiocholine, dont nous avons montré la spécificité différente d'hydrolyse par les enzymes du rectus de Grenouille, permet d'identifier localement la nature des activités cholinestérasiques.

Les résultats quantitatifs ont été exprimés par les *temps seuils de visualisation*, c'est-à-dire les temps d'incubation nécessaires à la formation d'une quantité de sulfure de cuivre colorant de façon liminaire les structures; ils varient en sens inverse des activités enzymatiques locales.

Ce procédé se rapproche de celui qui consisterait à déterminer l'activité biochimique à partir du temps nécessaire à la production d'une certaine quantité de CO₂. Il est cependant plus complexe. L'appréciation de la quantité de sulfure de cuivre est en effet tributaire des conditions d'observation.

Pour que la coloration soit visible dans les conditions de l'observation microscopique, il est nécessaire :

— d'une part, que les structures colorées présentent une surface supérieure à la limite de visibilité au microscope qu'on peut évaluer à environ un demi-micron carré;

— d'autre part, que le précipité de sulfure de cuivre ait une épaisseur minimum permettant d'obtenir, par absorption lumineuse, un contraste suffisant.

Ces conditions déterminent un volume que l'on peut appeler « unité visualisable ». Elles sont réunies en particulier pour les gouttières synaptiques des plaques motrices des fibres rapides et lentes et pour les jonctions musculo-tendineuses de ces fibres.

Les expériences d'inhibition ont été faites de façon systématique avec le D. F. P. et le 3318 CT. Pour le D. F. P., suivant les indications de KOELLE, on plonge les coupes pendant 30 minutes dans des solutions aqueuses à 37° C avant l'incubation avec les substrats. Le 3318 CT ainsi que la néostigmine et l'ésérine (utilisée dans quelques essais) sont dilués dans les bains de préincubation et d'incubation.

Les préparations sont soumises à une gamme de concentrations des inhibiteurs. Le temps seuil de visualisation est d'autant plus grand que l'inhibition a ralenti l'hydrolyse du substrat. En relevant les concentrations d'inhibiteurs pour lesquelles la coloration apparaît après des temps deux fois plus grands et beaucoup plus grands (>10) que le temps seuil témoin, il est possible de fixer avec approximation des inhibitions respectives de 50 % et sous-maximales (90 %).

Discussion de la méthode.

Les conditions d'expérimentation de la technique histochimique sont très différentes de celles des techniques biochimique et pharmacologique.

1° *Dans les conditions histochimiques*, l'activité enzymatique est considérablement réduite par le pH acide nécessaire à la formation du précipité de thiocholate de cuivre et par la formolisation.

Les cholinestérases de la Grenouille sont particulièrement sensibles à l'inactivation par le formol (TAXI, 1952). Après un contact d'une heure et demie avec du formol neutralisé à 10 %, il est très difficile de mettre en évidence une activité cholinestérasiq ue au niveau des jonctions neuromusculaires. Pour cette raison, la durée de la formolisation a été réduite à 30 minutes. Nous avons recherché par dosage biochimique au Warburg, dans quelle mesure les cholinestérases peuvent alors être affectées.

Les muscles sont broyés dans un mortier refroidi comme dans les expériences biochimiques, après avoir été fixés *in situ* avec du formol neutralisé à 10 %.

Dans ces conditions, l'hydrolyse de l'acétylthiocholine est réduite de 49,6 % et celle de la butyrylthiocholine de 38,6 %. L'inhibition de l'acétylcholinestérase et celle de la butyrylcholinestérase peuvent donc être considérées, aux erreurs d'expérience près, comme approximativement égales.

La formolisation n'altérera donc pas l'estimation des proportions respectives des deux enzymes.

2° Contrairement à ce que nous avons observé dans les expériences biochimiques, *l'hydrolyse non enzymatique des esters de la thiocholine n'a pas d'influence appréciable sur les résultats histochimiques.*

En effet, aucune coloration n'est apparue après 16 heures d'incubation avec l'acétylthiocholine et la butyrylthiocholine, sur des coupes de tissu

plongées au préalable dans des bains à 60° C et 80° C pendant trois minutes.

En outre, les fortes doses de D.F.P. suppriment définitivement les colorations, même après une incubation de 16 heures avec les deux substrats. Cette inhibition totale confirme que dans les conditions acides, les artefacts dus à l'action secondaire de la thiocholine, qui ont été observés dans les expériences biochimiques, n'interviennent pas ou peu.

En conséquence, seules les cholinestérases interviennent dans les conditions histochimiques; l'acétylcholinestérase et, à un moindre degré, la butyrylcholinestérase, dans l'hydrolyse de l'acétylthiocholine; la butyrylcholinestérase, dans celle de la butyrylthiocholine.

3° *Signification des résultats quantitatifs histochimiques. Relation avec les résultats biochimiques* — Comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent, les temps seuils de visualisation peuvent être convertis en activités. Ces activités ne sont pas cependant, comme dans la méthode biochimique, des activités globales résultant d'un dégagement gazeux homogène, mais des activités déterminées par unité de volume visualisable, dont la répartition, qui est l'objet propre de la méthode histochimique, n'est pas nécessairement homogène.

Il en résulte qu'aucune corrélation directe ne doit être attendue *a priori*, entre les deux méthodes : une activité cholinestérasique détectée par la méthode biochimique peut ne pas avoir de répondant histochimique si elle est répartie de façon diffuse ou dans un espace inférieur à l'unité visualisable et, inversement, une activité histochimique peut ne pas être détectée dans des essais biochimiques si elle est extrêmement localisée.

En outre, la comparaison des temps de visualisation obtenus avec un même substrat au niveau de formations différentes permet de connaître les concentrations locales respectives, mais non pas la répartition de la quantité globale entre ces formations : il faudrait pour cela dénombrer les « unités visualisables » dans l'ensemble des structures.

La comparaison des temps seuils de visualisation obtenus avec des substrats différents au niveau d'une même formation permet, par contre, une estimation très satisfaisante de leurs activités respectives puisque les volumes de visualisation y sont semblables.

RÉSULTATS. — 1° *Localisation des activités cholinestérasiques*. — Nous avons tout d'abord vérifié que la méthode de KOELLE met en évidence des activités cholinestérasiques à deux niveaux différents bien distincts des fibres musculaires du rectus de Grenouille : la jonction neuro-musculaire d'une part, la jonction musculo-tendineuse d'autre part (fig. 15).

A la jonction neuro-musculaire, l'activité cholinestérasique, localisée au niveau de la membrane sarcoplasmique, est post-synaptique. L'hypothèse de cette localisation avait été émise par COUTEAUX (1947), à partir d'obser-

vations biochimiques et physiologiques. Elle a été montrée pour les fibres rapides par COUTEAUX et TAXI (1931, 1952 *a* et *b*); pour les fibres lentes par COUTEAUX (1956).

Au niveau des insertions tendineuses, une activité cholinestérasique intense est localisée le long des culs-de-sac que forme la membrane sarcoplasmique et dans lesquels les fibrilles tendineuses se trouvent engagées (COUTEAUX, 1953, 1954 et 1958). COUTEAUX (1955) a émis l'hypothèse que cette activité cholinestérasique est liée à la membrane sarcoplasmique.

2° *Vitesses d'hydrolyse*. — Des colorations nettes des jonctions neuro-musculaires et musculo-tendineuses des fibres de gros calibre sont obtenues avec l'acétylthiocholine et la butyrylthiocholine. Les temps seuils de visualisation varient cependant suivant les cas (tableau XVI) :

— avec l'acétylthiocholine, une incubation nettement plus prolongée est nécessaire pour la coloration des jonctions musculo-tendineuses (25-45 mn) que pour celle des jonctions neuro-musculaires (10-15 mn);

— avec la butyrylthiocholine, la coloration des deux localisations apparaît à peu près simultanément (45-70 mn);

— les temps seuils de visualisation sont donc nettement plus longs avec la butyrylthiocholine qu'avec l'acétylthiocholine, mais le décalage est plus important pour les jonctions neuro-musculaires (10-15 à 45-70 mn) que pour les jonctions musculo-tendineuses (25-45 à 45-70 mn).

La présence de la membrane sarcoplasmique ne limite pas de façon sélective l'accessibilité des substances aux enzymes, puisque des essais réalisés sur des coupes transversales faites au niveau des régions neurales ou tendineuses donnent des résultats analogues à ceux obtenus sur des coupes longitudinales. Les résultats sont aussi les mêmes sur coupes de tissu frais ou fixé à pH 5,5.

FIG. 15. — A, B, C et D. — Activité cholinestérasique dans le rectus de Grenouille (méthode de Koelle et Friedenwald : fixation dans du formol neutralisé à 10 %, 30 minutes; pH 5,5).

En A. Myomère entier : incubation de 30 minutes avec l'acétylthiocholine. L'activité acétylcholinestérasique est localisée dans la partie moyenne des fibres au niveau des jonctions neuro-musculaires, et à leurs extrémités au niveau des insertions tendineuses (quelques chromatophores masquent l'activité des insertions du myosepte du haut).

En B. Myomère entier : incubation de deux heures avec la butyrylthiocholine. L'activité butyrylcholinestérasique est localisée comme l'activité acétylcholinestérasique au niveau des jonctions neuro-musculaires et des jonctions musculo-tendineuses.

En C et D. Buissons de Kühne : incubations respectivement avec l'acétylthiocholine (1 heure) et avec la butyrylthiocholine (2 heures).

En E. Faisceau de fibres lentes du gastrocnémien de Grenouille (méthode de Koelle et Friedenwald : fixation dans du formol neutralisé à 10 %, 30 minutes; incubation avec l'acétylthiocholine, 1 heure; pH 5,5).

L'activité cholinestérasique est localisée au niveau des petites jonctions neuro-musculaires et des jonctions musculo-tendineuses.

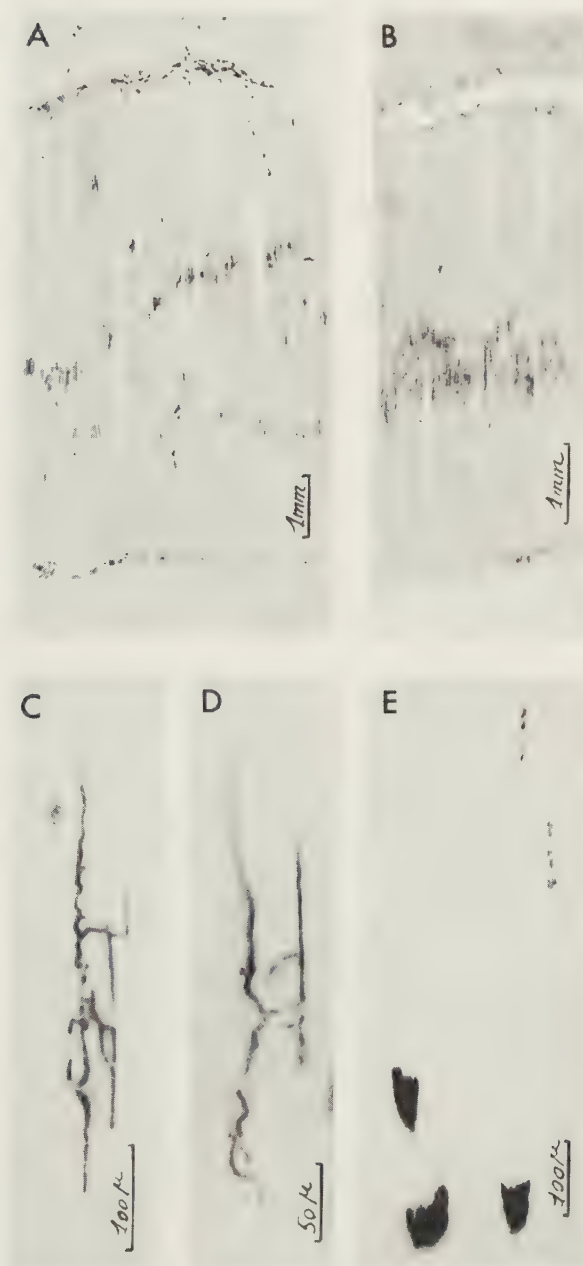


FIG. 15 A à E.

TABLEAU XVI

TEMPS SEUILS DE VISUALISATION DES COLORATIONS AVEC L'ACÉTYLTHIOCHOLINE ET LA BUTYRYLTHIOCHOLINE A pH 5,5

Muscles	Fibres	Localisations	AcThCh	BuThCh
Rectus.	Fibres rapides.	Jonctions neuro-musculaires. Jonctions musculo-tendineuses.	10-15 mn 25-45 mn	45-70 mn 45-70 mn
	Fibres lentes.	Jonctions neuro-musculaires. Jonctions musculo-tendineuses.	30-45 mn 20-30 mn	45-75 mn 45-75 mn
Gastro- cnémien.	Fibres rapides.	Jonctions neuro-musculaires.	10-15 mn	75 mn (?)
	Fibres lentes.	Jonctions neuro-musculaires. Jonctions musculo-tendineuses.	45-75 mn 20-30 mn	75 mn (?)

(?) Temps déterminé approximativement en raison de la diffusion.

Par contre, à pH 5,3, l'action inactivante du formol semble plus importante puisque, avec les deux substrats, les colorations apparaissent plus tardivement sur les préparations de muscle fixé que sur celles du muscle frais. Les différences sont relevées dans le tableau XVII.

Les fibres lentes présentent des caractéristiques générales semblables à celles des fibres rapides. Cependant, il existe une différence : avec l'acétylthiocholine, le temps seuil de visualisation des insertions (20-30 mn) est non pas plus long comme c'est le cas pour les fibres rapides, mais plus bref que celui des jonctions neuro-musculaires (45 mn).

TABLEAU XVII

RECTUS DE GRENOUILLE. TEMPS SEUILS DE VISUALISATION DES COLORATIONS AVEC L'ACÉTYLTHIOCHOLINE ET LA BUTYRYLTHIOCHOLINE A pH 5,3

Rectus de Grenouille		AcThCh		BuThCh	
		Muscle frais	Muscle fixé	Muscle frais	Muscle fixé
Fibres rapides.	Jonctions neuro-musculaires.	15 mn	30 mn	75 mn- 120 mn	105 mn- 150 mn
	Jonctions musculo-tendineuses.	50 mn- 60 mn	60 mn- 75 mn	75 mn- 120 mn	105 mn- 150 mn

Dans les essais réalisés avec le gastrocnémien, des résultats tout à fait superposables ont été obtenus avec l'acétylthiocholine. Par contre, avec la butyrylthiocholine, les temps seuils de visualisation sont nettement plus longs, et il est difficile de les relever avec précision, car la diffusion interfère.

3° *Inhibition des colorations par les anticholinestérasiques.* — Les concentrations inhibitrices 50 % et sous-maximales, calculées comme il a été dit dans la technique, ont été établies pour les jonctions neuro-musculaires et les insertions tendineuses des fibres rapides et des fibres lentes (tableau XVIII).

a) *Fibres rapides.* — Aux erreurs d'expérience près, les concentrations inhibitrices 50 % sont caractéristiques de l'inhibiteur et du substrat et non pas de la localisation. Avec le D. F. P., elles sont respectivement de $8 \cdot 10^{-9}$ M et $2 \cdot 10^{-7}$ M pour la butyrylthiocholine et l'acétylthiocholine. Avec le 3318 CT, elles sont respectivement de $0,3-1 \cdot 10^{-5}$ et $5-6 \cdot 10^{-3}$ M pour l'acétylthiocholine et la butyrylthiocholine. Une fois de plus, on retrouve la spécificité d'action de ces deux inhibiteurs.

Il en est de même en général pour les concentrations inhibitrices sous-maximales: Avec l'acétylthiocholine cependant, celles du D. F. P. sont nettement plus faibles pour les jonctions musculo-tendineuses ($5 \cdot 10^{-7}$ M) que pour les jonctions neuro-musculaires ($3 \cdot 10^{-6}$ M).

L'action inhibitrice de la Néostigmine a été étudiée uniquement à pH 5,3 sur coupes de muscle frais et fixé. La concentration inhibant la coloration au temps seuil de visualisation est, pour les deux substrats, aux jonctions neuro-musculaires et musculo-tendineuses, de $3 \cdot 10^{-7}$ M.

b) Dans le cas des fibres lentes, les CI 50 et sous-maximales sont semblables à celles obtenues avec les fibres rapides. Ces chiffres sont cependant moins rigoureux que dans le cas précédent, parce que la rareté de ces fibres sur les préparations n'a pas permis un nombre aussi important de déterminations.

4° *Discussion des résultats histochimiques.* — Les colorations obtenues avec l'acétylthiocholine et la butyrylthiocholine établissent l'existence des deux cholinestérases au niveau des jonctions neuro-musculaires et musculo-tendineuses des fibres rapides et lentes du rectus de Grenouille.

La présence d'une acétylcholinestérase aux insertions tendineuses surprend en raison de la nature absolument aneurale de ces formations. Il est intéressant aussi de noter la présence d'une butyrylcholinestérase aux jonctions neuro-musculaires.

L'activité de l'acétylcholinestérase (hydrolysant en prédominance l'acétylthiocholine) est plus importante aux synapses qu'aux insertions tendineuses des fibres rapides. Le rapport des temps seuils de visualisation obtenus avec l'acétylthiocholine permet d'évaluer approximativement

TABLEAU XVIII

INHIBITION DES HYDROLYSES DE L'ACÉTYLTHIOCHOLINE ET DE LA BUTYRYLTHIOCHOLINE PAR LE D. F. P., LE 3318 CT ET L'ÉSÉRINE AUX JONCTIONS NEURO-MUSCULAIRES ET MUSCULO-TENDINEUSES DU RECTUS DE GRENOUILLE.

		AcThCh		BuThCh	
		CI 50	CI s/max.	CI 50	CI s/max.
<i>D. F. P.</i>					
Fibres rapides.	J. N.	$2 \cdot 10^{-7}$ M	$3 \cdot 10^{-6}$ M	$7 \cdot 5 \cdot 10^{-9}$ M	$5 \cdot 10^{-8}$ M
	J. T.	$1 \cdot 2 \cdot 10^{-7}$ M	$5 \cdot 10^{-7}$ M	$6 \cdot 10^{-9}$ M	$3 \cdot 10^{-8}$ M
Fibres lentes.	J. N.	$1 \cdot 10^{-7}$ M	$1 \cdot 10^{-6}$ M	$3 \cdot 10^{-9}$ M	$3 \cdot 10^{-8}$ M
	J. T.	$1 \cdot 10^{-7}$ M	$1 \cdot 10^{-6}$ M	$3 \cdot 10^{-9}$ M	$3 \cdot 10^{-8}$ M
<i>3318 CT</i>					
Fibres rapides.	J. N.	$3 \cdot 10^{-6}$ - $1 \cdot 10^{-5}$ M	$1 \cdot 10^{-4}$ M	$8 \cdot 10^{-4}$ M	$6 \cdot 10^{-3}$ M
	J. T.	$3 \cdot 10^{-6}$ - $1 \cdot 10^{-5}$ M	$1 \cdot 10^{-4}$ M	$8 \cdot 10^{-4}$ M	$5 \cdot 10^{-3}$ M
Fibres lentes.	J. N.	$1 \cdot 10^{-5}$ M	$1 \cdot 10^{-4}$ M	$6 \cdot 10^{-4}$ M	$6 \cdot 10^{-3}$ M
	J. T.	$1 \cdot 10^{-5}$ M	$1 \cdot 10^{-4}$ M	$6 \cdot 10^{-4}$ M	$6 \cdot 10^{-3}$ M
<i>Esérine.</i>					
Fibres rapides.	J. N.	$2 \cdot 10^{-6}$ M	$1 \cdot 10^{-5}$ M	$1 \cdot 2 \cdot 10^{-7}$ M	$3 \cdot 10^{-6}$ M $1 \cdot 10^{-5}$ M
	J. T.	$2 \cdot 10^{-6}$ M	$1 \cdot 10^{-5}$ M	$1 \cdot 2 \cdot 10^{-7}$ M	$3 \cdot 10^{-6}$ M $1 \cdot 10^{-5}$ M
(Concentrations moléculaires inhibitrices 50 % ([CI 50] et concentrations moléculaires inhibitrices sous-maximales [CI s/max.] de D. F. P., de 3318 CT et d'ésérine.)					
- pH 5,5.					
J. N. : jonctions neuro-musculaires.					
J. T. : jonctions musculo-tendineuses.					

L'activité locale de l'enzyme au niveau des jonctions neuro-musculaires comme 2,3 fois supérieure à celle des insertions tendineuses. Une différence semblable a été signalée dans le muscle abdominal et le diaphragme du Rat par SCHWARZACHER (1960).

L'activité butyrylcholinestérasique locale est par contre égale dans les deux structures, puisque la coloration avec la butyrylthiocholine y apparaît simultanément. Comme l'activité acétylcholinestérasique est plus faible aux insertions tendineuses, l'activité butyrylcholinestérasique y est relativement plus importante. Elle peut être évaluée, à ce niveau, à partir des temps seuils de visualisation (45-70 mn pour la butyrylthiocholine et

25-45 mn pour l'acétylthiocholine), à environ 50 % de l'activité acétylcholinestérasique, tandis qu'au niveau des jonctions neuro-musculaires (45-70 mn pour la butyrylthiocholine et 10-15 mn pour l'acétylthiocholine) elle représente seulement environ 25 % de l'activité acétylcholinestérasique.

Cette différence entre les deux localisations est mise en évidence aussi par l'inhibition de l'hydrolyse de l'acétylthiocholine par le D. F. P. L'inhibition a lieu en effet pour des concentrations plus faibles au niveau des insertions tendineuses. La butyrylcholinestérase semble donc intervenir plus à ce niveau dans l'hydrolyse de l'acétylthiocholine.

Il est difficile de tirer des conclusions aussi détaillées dans le cas des fibres lentes. En effet, l'apparition des colorations n'est pas nette au niveau des petites jonctions neuro-musculaires, très dispersées, qui sont, dans les conditions d'observation, à la limite du pouvoir séparateur au microscope. On peut cependant dire avec certitude que, contrairement aux fibres rapides, l'activité acétylcholinestérasique locale est plus importante aux insertions tendineuses qu'aux jonctions neuro-musculaires. COUTEAUX (1956) avait déjà signalé cette différence caractéristique entre les deux types de fibres. Comme pour les fibres rapides, l'activité butyrylcholinestérasique est plus faible que l'activité acétylcholinestérasique à tous les niveaux.

Les fibres lentes superficielles du gastrocnémien présentent des activités acétylcholinestérasiques locales semblables à celles du rectus. L'activité butyrylcholinestérasique est, par contre, plus faible et difficile à localiser.

*Comparaison des résultats obtenus
avec les méthodes biochimique et histochemique.*

On constate qu'il existe une corrélation générale entre les résultats obtenus par les deux méthodes :

— l'activité butyrylcholinestérasique est relativement plus importante dans la région aneurale-tendineuse que dans la zone d'innervation motrice;

— les concentrations inhibitrices de 3318 CT et de D. F. P. sont, dans la plupart des cas, très semblables, aux erreurs d'expériences près (tableau XIX).

Les concentrations de 3318 CT qui inhibent de 50 % et de façon sous-maximale l'hydrolyse de l'acétylthiocholine sont respectivement de $1 \cdot 10^{-6}$ M et $3 \cdot 10^{-4}$ M sur broyats et de $3 \cdot 10^{-6}$ - $1 \cdot 10^{-5}$ M et $1 \cdot 10^{-4}$ M, *in situ*, au niveau des jonctions neuro-musculaires et musculo-tendineuses.

Celles de D. F. P. qui inhibent l'hydrolyse de la butyrylthiocholine sont

TABLEAU XIX
COMPARAISON DES INHIBITIONS OBTENUES « IN VITRO » SUR BROYATS DE MUSCLE ENTIER ET « IN SITU »
AU NIVEAU DES JONCTIONS NEURO-MUSCULAIRES ET MUSCULO-TENDINEUSES DES FIBRES RAPIDES DU RECTUS DE GRENOUILLE

	Ac ¹¹⁴ Ch				Bu ¹¹⁴ Ch			
	CI 50		CI s/max.		CI 50		CI s/max.	
	Hist.	Bioch.	Hist.	Bioch.	Hist.	Bioch.	Hist.	Bioch.
D. F. P. Jonctions neuro-musculaires. Jonctions musculo-tendineuses.	$2 \cdot 10^{-7}$		$3 \cdot 10^{-6}$		$7 \cdot 5 \cdot 10^{-6}$		$5 \cdot 10^{-8}$	
	$1 \cdot 2 \cdot 10^{-7}$	$1 \cdot 3 \cdot 10^{-6}$	$5 \cdot 10^{-7}$	$1 \cdot 10^{-4}$	$8 \cdot 10^{-6}$	$6 \cdot 10^{-6}$	$3 \cdot 10^{-8}$	$1 \cdot 10^{-7}$
3318 CT Jonctions neuro-musculaires. Jonctions musculo-tendineuses.	$3 \cdot 10^{-6}$ $1 \cdot 10^{-5}$		$1 \cdot 10^{-4}$		$8 \cdot 10^{-4}$		$6 \cdot 10^{-3}$	
	$3 \cdot 10^{-6}$ $1 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-4}$	$3 \cdot 10^{-4}$	$8 \cdot 10^{-4}$		$5 \cdot 10^{-3}$	

Les concentrations inhibitrices 50 % (CI 50) et sous-maximales (CI s/max.) sont calculées suivant les indications données dans les techniques.
Les résultats histochimiques sont ceux obtenus sur les fibres rapides en raison de leur prédominance dans le rectus.

respectivement de $6 \cdot 10^{-9}$ M et $1 \cdot 10^{-7}$ M sur broyats et de $8 \cdot 10^{-9}$ M et $1 \cdot 10^{-7}$ M, *in situ*.

La corrélation n'est toutefois pas absolue; de faibles écarts sont relevés pour ces deux points :

— Dosée par la méthode histochimique, l'activité butyrylcholinestérasique représente 50 et 25 % de l'activité acétylcholinestérasique aux insertions tendineuses et aux jonctions neuro-musculaires. Par la méthode biochimique, elle est respectivement de 36 et 28 % dans les broyats contenant ces deux types de structures.

L'activité butyrylcholinestérasique relative apparaît donc différente suivant qu'elle est dosée par la méthode biochimique dans la portion tendineuse (36 %) ou par la méthode histochimique au niveau des insertions elles-mêmes (50 %).

— L'inhibition par le D. F. P. de l'hydrolyse de l'acétylthiocholine, contrairement à son inhibition par le 3318 CT, présente des écarts très importants qui atteignent deux puissances pour les CI 50 ($2 \cdot 10^{-7}$ M par la méthode histochimique, $3 \cdot 10^{-5}$ M par la méthode biochimique).

Pour la première divergence, l'écart peut provenir des erreurs expérimentales, inhérentes aux méthodes, ou du dosage, dans les deux techniques, d'activités cholinestérasiques localisées à des niveaux différents. Elle résulte vraisemblablement pour une grande part du dosage dans les broyats de la portion tendineuse de l'activité de buissons de Kühne, localisés près des insertions dans certaines fibres (voir p. 381). Une concordance générale ne pouvait, d'autre part, être attendue (voir p. 381) que dans le cas idéal où le dosage biochimique rend compte uniquement des activités détectées par la méthode histochimique. La présence d'une activité aneurale pourrait ainsi expliquer l'écart. MARNAY et NACHMANSOHN (1937 *b* et 1938) ont pu en effet doser une activité cholinestérasique aneurale dans les muscles de la Grenouille. Cette hypothèse impliquerait que cette activité aneurale « diffuse » du rectus de Grenouille est surtout de nature acétylcholinestérasique.

Les écarts observés entre les valeurs de l'inhibition par le D. F. P. sont trop importants pour qu'on puisse les attribuer aux seules erreurs expérimentales. L'explication de ce phénomène est malaisée. On peut penser :

— que les fortes concentrations de D. F. P. ne seraient pas spécifiques des cholinestérases et que l'inhibiteur se fixerait non seulement sur des enzymes mais aussi sur diverses autres protéines particulièrement accessibles lorsqu'elles sont en suspension dans le broyat;

— ou bien que des cholinestérases, localisées en dehors des jonctions neuro-musculaires et musculo-tendineuses et dosées dans les broyats, seraient moins aisément inhibées par le D. F. P. que l'acétylcholinestérase synaptique. Cette explication rejoindrait l'interprétation donnée pour la première divergence. Rien ne permet cependant de conclure.

D. — CONCLUSION

L'activité cholinestérasique est localisée en prédominance à deux niveaux distincts des fibres rapides et lentes du rectus de Grenouille : jonctions neuro-musculaires et jonctions musculo-tendineuses. Les deux cholinestérases y sont présentes; l'activité locale de l'acétylcholinestérase est plus faible aux insertions qu'au niveau de l'innervation motrice, tandis que celle de la butyrylcholinestérase est très semblable à ces deux niveaux. La composition quantitative du mélange cholinestérasique est différente : l'activité butyrylcholinestérasique est en effet relativement plus importante aux insertions tendineuses qu'aux jonctions neuro-musculaires. Elle peut être évaluée, approximativement et respectivement pour ces deux niveaux, à 50 et 25 % de l'activité acétylcholinestérasique locale.

La présence d'une activité cholinestérasique de nature « diffuse » est admise seulement à titre hypothétique, pour expliquer une partie des écarts observés entre les résultats des diverses méthodes.

IV. — MUSCLES ET ORGANES ÉLECTRIQUES
DU POISSON

L'étude du système cholinestérasique chez le Poisson a été faite sur le muscle latéral du Poisson-chat (*Ameiurus nebulosus*) et sur les organes électriques du Malaptérure (*Malapterurus electricus*) et du Gnathonémus (*Gnathonemus senegalensis elongatus*).

FIG. 16. — En A. Répartition de l'activité cholinestérasique dans le muscle latéral du Poisson-chat. Coupe longitudinale (méthode de Koelle et Friedenwald : fixation dans du formol neutralisé à 10 %, 30 minutes; incubation avec l'acétylthiocholine, 15 minutes; pH 5,3).

En a, muscle latéral superficiel : coloration des jonctions neuro-musculaires très nombreuses, réparties sur toute la surface des fibres, et des jonctions musculo-tendineuses qui marquent la limite entre deux myomères consécutifs.

En b, zone superficielle du muscle latéral profond : coloration des jonctions neuro-musculaires en arborisation dans la partie moyenne des fibres et des jonctions musculo-tendineuses à leurs extrémités.

En c, zone profonde du muscle latéral profond : aucune coloration n'est visible en dehors de la région des myoseptes où sont localisées les activités des jonctions neuro-musculaires et des jonctions musculo-tendineuses.

En B. Répartition de l'activité cholinestérasique dans le muscle latéral superficiel du Poisson-chat. Coupe longitudinale (méthode de Koelle et Friedenwald : fixation dans du formol neutralisé à 10 %, 45 minutes; incubation avec l'acétylthiocholine, 18 minutes; pH 5,5).

Les jonctions neuro-musculaires sont multiples. Les insertions tendineuses de deux myomères consécutifs sont jointives ou distantes du myosepte.

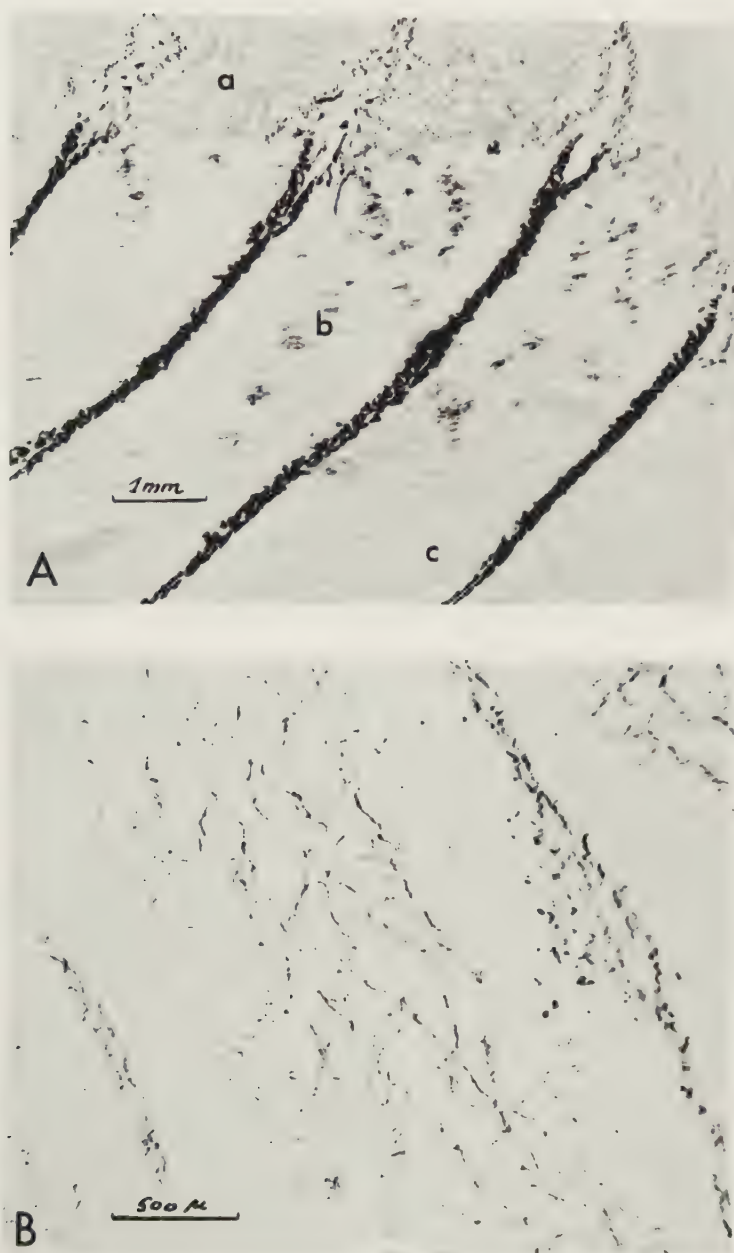


FIG. 16 A et B.

A. — MUSCLE LATÉRAL DU POISSON-CHAT

BARETS (1952, 1956 et 1960) a montré que le muscle latéral des poissons téléostéens est constitué de deux parties distinctes, séparées longitudinalement par un mince fascia; leurs caractères anatomiques et leurs propriétés électrophysiologiques respectifs ont permis de les rapprocher des deux systèmes musculaires mis en évidence chez la Grenouille (KUFFLER, 1953 a) :

— La portion superficielle (muscle latéral superficiel) se rapproche des fibres « lentes » et la portion profonde (muscle latéral profond) des fibres « rapides » de la Grenouille. En ce qui concerne plus particulièrement le Poisson-chat, les deux portions se différencient en premier lieu par les calibres moyens de leurs fibres : 10 à 40 μ pour le muscle superficiel, 30 à 100 μ pour le profond; par la richesse relative plus importante du muscle superficiel en sarcoplasme; par sa couleur rouge due à une concentration importante en myoglobine et à une riche vascularisation. Ces caractères distinctifs varient dans chacune des deux portions du muscle latéral selon une gradation continue, mais dans des directions topographiquement opposées, ce qui souligne l'individualité de ces deux muscles (BARETS, 1952).

— Les deux portions du muscle latéral du Poisson-chat se distinguent, d'autre part, par la nature de leurs jonctions neuro-musculaires. Celles du muscle latéral superficiel sont de type multiple en forme de cupules distribuées le long des fibres. Le muscle latéral profond présente deux types d'innervation : dans la partie superficielle, l'innervation motrice se termine dans la région moyenne des fibres par des arborisations comparables à celles rencontrées dans les muscles d'autres Vertébrés; dans la partie profonde, l'innervation est uniquement « myoseptale ». Ces trois innervations correspondent à des territoires définis du muscle latéral (fig. 16). Comme chez les Amphibiens, à des fibres musculaires différentes correspondent des types d'innervation motrice différents (GUNTHER, 1949; COUTEAUX, 1952).

— Enfin, la réponse à une stimulation électrique directe du muscle latéral superficiel du Poisson-chat n'est obtenue qu'à la suite d'une excitation répétitive et croît avec la fréquence des chocs jusqu'à une valeur maximale (BARETS et LE TOUZE, 1956). Au contraire, la stimulation électrique du muscle latéral profond, directe ou par l'intermédiaire du nerf moteur, provoque une réponse coup pour coup et donne naissance à un potentiel propagé typique (BARETS, FESSARD et LE TOUZE, 1956). Une différenciation électrophysiologique correspond donc, comme chez la Grenouille, à une différenciation structurale (KUFFLER et VAUGHAN, WILLIAMS, 1953 a).

En préambule à notre étude du système cholinestérasique du muscle

latéral du Poisson-chat, nous avons été amenée à rechercher si les caractéristiques anatomiques électrophysiologiques des deux portions de ce muscle correspondaient à des caractéristiques pharmacologiques par leur réponse et leur sensibilité aux substances dépolarisantes.

C'est pourquoi nous avons comparé la nature des réponses des deux portions isolées du muscle latéral du Poisson-chat à l'action de deux types de substances dépolarisantes : le chlorure de potassium d'une part, dont l'action dépolarisante s'exerce sur toute la surface des fibres musculaires, et deux esters de la choline, l'acétylcholine et la butyrylcholine d'autre part, dont l'action est localisée aux plaques motrices (KUFFLER, 1943). Nous avons ensuite recherché si les deux portions musculaires se distinguent, comme les deux systèmes musculaires de la Grenouille, par une sensibilité différente aux substances dépolarisantes. Une partie de ce travail a fait l'objet d'une note en collaboration avec M. BARETS (BARETS et PECOT-DECHAVASSINE, 1959).

L'étude du système cholinestérasique des deux portions du muscle latéral du Poisson-chat a été faite comme pour le rectus de Grenouille, au moyen des trois techniques, biochimique, pharmacologique et histo-chimique.

Pour ces trois techniques, le muscle superficiel est prélevé au niveau de la ligne latérale où il est prédominant, le muscle profond à un niveau dorsal ou ventral où il constitue la presque totalité de la musculature. Les préparations de l'un ou l'autre muscle ne sont cependant pas pures; elles contiennent quelques fibres de l'autre portion. Nous évitons en effet de léser les fibres par une séparation trop rigoureuse.

1° RÉPONSES DES MUSCLES SUPERFICIEL ET PROFOND A DES AGENTS DÉPOLARISANTS

TECHNIQUE. — Les portions du muscle latéral superficiel et latéral du Poisson-chat sont immergées dans des bains de 50 ml, contenant du liquide physiologique préconisé par Young (1933) pour les Téléostéens d'eau douce. La composition de ce liquide est la suivante :

Chlorure de sodium	5,5 g
Chlorure de potassium	0,14 g
Chlorure de calcium	0,12 g
pour 1 000 ml d'eau distillée.	

L'oxygénation est assurée par de l'air comprimé. Les contractions sont enregistrées avec un levier isotonique à inscription frontale.

Les substances dépolarisantes sont le chlorure de potassium (ClK), l'iodure d'amyltriméthylammonium (AmT) et les chlorures d'acétylcholine (ACh) et de butyrylcholine (BuCh).

RÉSULTATS. — *Muscle superficiel.* — La réponse du muscle latéral superficiel aux diverses substances dépolarisantes est une contracture qui se développe lentement, analogue à celle décrite pour le rectus de Grenouille. En général, on n'observe pas de différence nette entre les réponses aux esters de la choline et les contractions provoquées par les substances non hydrolysables (fig. 17).

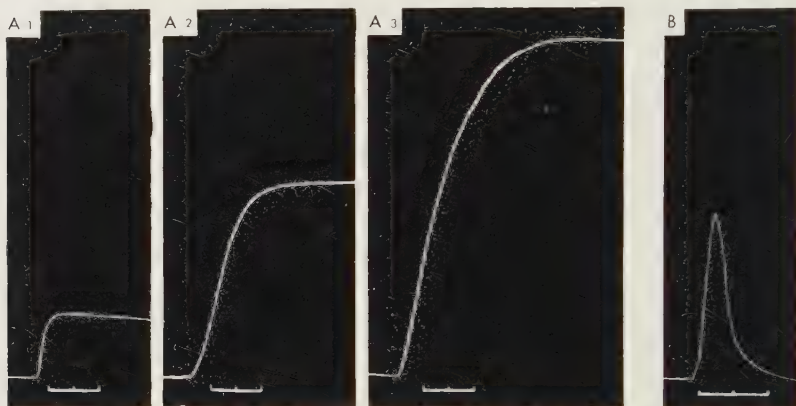


FIG. 17. — A. Muscle latéral superficiel du Poisson-chat.

A₁, acétylcholine 20 $\mu\text{g/ml}$.

A₂, butyrylcholine 20 $\mu\text{g/ml}$.

A₃, chlorure de potassium 1,5 mg/ml.

B. Muscle latéral profond du Poisson-chat. Chlorure de potassium 1 mg/ml. Temps en minutes. (BARETS et PECOT-DECHAVASSINE, 1959.)

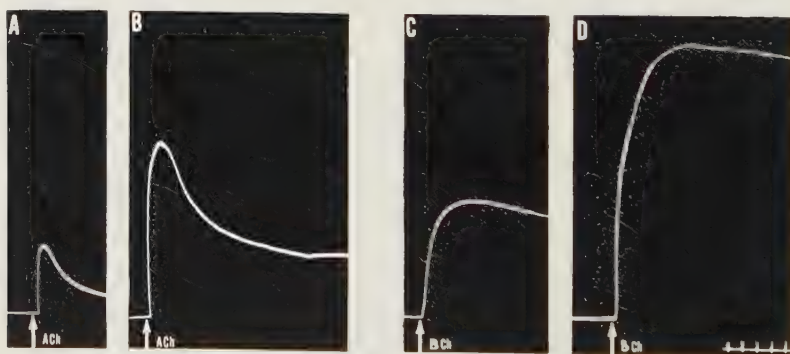


FIG. 18. — Muscle latéral superficiel du Poisson-chat. Comparaison des réponses à l'acétylcholine et à la butyrylcholine.

↑ ACh : acétylcholine, ↑ BCh : butyrylcholine.

En A : acétylcholine 20 $\mu\text{g/ml}$.

En B : acétylcholine 200 $\mu\text{g/ml}$.

En C : butyrylcholine 4 $\mu\text{g/ml}$.

En D : butyrylcholine 10 $\mu\text{g/ml}$.

Temps en 30 secondes.

Cependant, avec les esters de la choline, on observe parfois, avant le lavage, un relâchement partiel conduisant à un plateau durable. Ce phénomène se produit le plus souvent avec l'acétylcholine, plus rarement avec la butyrylcholine (par exemple dans l'expérience illustrée par la figure 18, seule la réponse à l'acétylcholine n'est pas soutenue; par contre, dans celle de la figure 19, le phénomène existe aussi pour la butyrylcholine).

Les concentrations liminaires efficaces des substances dépolarisantes sont : 0,05 % pour le chlorure de potassium, 2 μ g/ml pour l'amytriméthyl-

FIG. 19.

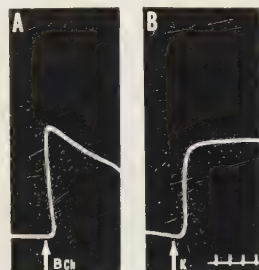
Muscle latéral superficiel du Poisson-chat. Comparaison des réponses à la butyrylcholine et au chlorure de potassium.

↑ BCh : butyrylcholine. ↑ K : Chlorure de potassium.

En A : butyrylcholine 40 μ g/ml.

En B : chlorure de potassium, 0,3 %.

Temps en 30 secondes.



ammonium, 20 μ g pour l'acétylcholine et 2 μ g/ml pour la butyrylcholine. Pour des effets d'amplitude semi-maximale, l'amytriméthylammonium et la butyrylcholine sont 30 et 40 fois actifs que l'acétylcholine.

Les pentes des courbes doses/action, calculées dans la partie moyenne des courbes, sont respectivement de 2,51, 1,6 et 0,31 pour le chlorure de potassium, la butyrylcholine et l'acétylcholine (tableau XX).

TABLEAU XX

MUSCLE LATÉRAL SUPERFICIEL DU POISSON-CHAT. PENTE DES COURBES DOSES-ACTION DE L'ACÉTYLCHOLINE, DE LA BUTYRYLCHOLINE ET DE L'AMYLTRIMÉTHYLAMMONIUM SUR MUSCLE NORMAL ET TRAITÉ PAR LES ANTICHOLINESTÉRASIQUES.

Substances contracturantes	Pentes des courbes		
	Sur muscle normal	Sur muscle traité par des anticholinestérasiques	
ACh	0,31	Esérine 1 . 10 ⁻⁶ M	1,08
ACh	0,25		
ACh	0,25		
ACh	0,27	Néostigmine 1 . 10 ⁻⁶ M ..	0,7
ACh	0,51	D. F. P. 1 . 10 ⁻⁵ M	2,1
Moyenne	0,31		1,28
BuCh	1,6	Néostigmine 2 . 10 ⁻⁶ M ..	1,85
ClK	2,51		

Muscle latéral profond. — Il est beaucoup plus malaisé de stimuler le muscle latéral profond. Pour des doses optimales, la réponse au ClK et aux esters de la choline est rapide, peu durable; elle rétrocede spontanément malgré la présence de la substance dépolarisante (fig. 17 et 20). Parfois, avec les esters de la choline, notamment avec l'acétylcholine, le

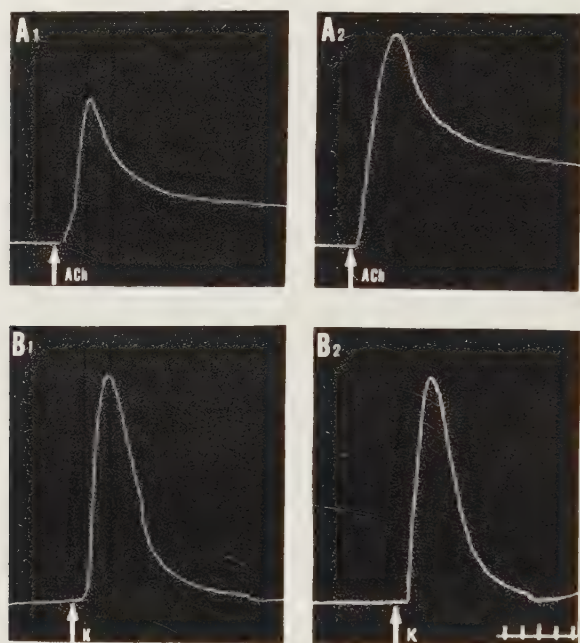


FIG. 20. — Muscle latéral profond du Poisson-chat. Action de l'ésérine sur la sensibilité à l'acétylcholine et au chlorure de potassium.

En A : acétylcholine :

A₁ : acétylcholine 200 $\mu\text{g/ml}$;

A₂ : après ésérine $1 \cdot 10^{-6}$ M, acétylcholine 20 $\mu\text{g/ml}$.

En B : chlorure de potassium :

B₁ : chlorure de potassium 1 %;

B₂ : après ésérine $1 \cdot 10^{-6}$ M, chlorure de potassium 1 %.

Temps en 30 secondes.

relâchement, rapide au début, ralentit ensuite et conduit à un plateau (fig. 20).

Contrairement au muscle superficiel, la zone des concentrations actives est très étroite. Des doses immédiatement supérieures ou inférieures aux doses optimales sont inactives. Les concentrations optimales sont respectivement de 10 mg/ml, 200 $\mu\text{g/ml}$ et 20 $\mu\text{g/ml}$ pour le chlorure de potassium, l'acétylcholine et la butyrylcholine.

DISCUSSION. — Les deux portions du muscle latéral du Poisson-chat se différencient par la nature de leur réponse et par les concentrations actives des substances dépolarisantes.

Le muscle latéral superficiel présente en général, lorsqu'il est mis au contact des diverses substances dépolarisantes, un raccourcissement durable, analogue à celui observé avec les fibres musculaires « lentes » de la Grenouille (fibres toniques) (SOMMERKAMP, 1928; WACHHOLDER et VON LEDEBUR, 1930; WACHHOLDER et NOTHMANN, 1932); le muscle profond se contracte et se relâche comme le font les fibres « rapides » (fibres « non toniques » ou « tétaniques » du muscle de Grenouille (KUFFLER et VAUGHAN WILLIAMS, 1953 *b*). Les résultats pharmacologiques confirment donc comme pour la Grenouille (KUFFLER, 1953) la distinction en fibres « lentes » du muscle superficiel et en fibres « rapides » du muscle

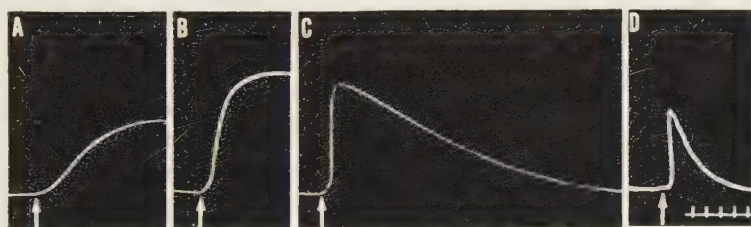


FIG. 21. — Réponses du muscle latéral superficiel du Poisson-chat à des doses croissantes de chlorure de potassium.

En A, 1,5 mg/ml; B, 3 mg/ml; C, 10 mg/ml; D, 20 mg/ml.

Temps en 30 secondes.

profond, proposée antérieurement d'après les caractéristiques morphologiques et électrophysiologiques de ces muscles par BARETS (1952), BARETS et LE TOUZE (1956), BARETS, FESSARD et LE TOUZE (1956).

Cependant, avec les esters de la choline, notamment avec l'acétylcholine, les réponses des muscles superficiel et profond ne sont pas toujours de type nettement différent. Parfois, une réponse de type mixte est obtenue. Les variations résultent en partie du manque d'homogénéité des préparations. Elles résultent surtout de la nature hydrolysable des esters. L'intervention de ce dernier facteur sera étudiée plus loin au cours de l'étude du système cholinestérasique.

Les deux muscles se différencient aussi par leur sensibilité. Des concentrations de chlorure de potassium, d'acétylcholine et de butyrylcholine environ dix fois supérieures aux concentrations actives sur le muscle superficiel sont nécessaires pour obtenir une réponse du muscle profond. Contrairement au muscle superficiel, dont la réponse croît avec la dose, la zone des concentrations actives sur le muscle profond est très étroite.

Pour des doses de chlorure de potassium supérieures aux concentrations optimales, le muscle superficiel présente un raccourcissement non

soutenu, analogue à celui observé avec le muscle profond (fig. 21). Cet effet est obtenu pour des concentrations de ClK qui provoquent une contraction semblable du muscle profond. Les différences qualitatives entre les deux types des réponses pourraient donc être en réalité des différences quantitatives résultant de la sensibilité différente des deux muscles : le muscle profond n'est pas sensible aux doses provoquant une contraction soutenue du muscle superficiel; il l'est à des concentrations plus élevées qui provoquent des réponses de même type des deux muscles.

WACHHOLDER et NOTHMANN (1932) ont obtenu de même une contraction non soutenue des muscles toniques de la Grenouille sous l'effet de fortes concentrations d'acétylcholine.

KUFFLER et VAUGHAN WILLIAMS (1953 *b*), KUFFLER (1953) rappellent que, inversement, dans certaines conditions, des muscles rapides de Grenouille peuvent donner des contractures réversibles : la contracture réversible (1) de Bremer (BREMER et DESMEDT, 1947) est obtenue par une stimulation double directe et indirecte; elle est accompagnée d'un influx propagé.

En somme, les différences anatomiques et électrophysiologiques signalées pour les deux portions du muscle latéral du Poisson-chat correspondent, dans des conditions déterminées, à des différences pharmacologiques par leur réponse et leur sensibilité aux substances dépolarisantes. Ces divers critères permettent d'affirmer que les deux portions du muscle latéral du Poisson-chat appartiennent à deux systèmes différents, le muscle superficiel au « système lent », le muscle profond au « système rapide ».

2° ETUDE DU SYSTÈME CHOLINESTÉRASIQUE DU MUSCLE LATÉRAL DU POISSON-CHAT

a) Etude biochimique.

Les essais biochimiques sont réalisés comme pour le rectus de Grenouille avec la méthode manométrique de Warburg-Ammon. Les conditions expérimentales sont celles décrites antérieurement. La concentration terminale des extraits musculaires est notamment de 1/15, soit 0,2 g de muscle par cupule. En raison de l'épuisement rapide du substrat, les lectures ne sont pas poursuivies au-delà de 15 minutes.

RÉSULTATS. — 1° *Vitesses d'hydrolyse de l'acétylcholine et de la butyrylcholine.* — Les deux portions du muscle latéral du Poisson-chat hydrolysent l'acétylcholine : les dégagements sont plus importants pour le

(1) Elle est distincte de la contracture irréversible d'un muscle rapide qui survient après le passage d'un très fort courant électrique.

muscle superficiel (1598 $\mu\text{l CO}_2/0,2 \text{ g}$) par heure que pour le muscle profond (930 $\mu\text{l CO}_2/0,2 \text{ g}$ par heure).

Elles hydrolysent aussi la butyrylcholine, mais que ce soit en valeur absolue (29,9 et 13,2) ou par rapport à l'acétylcholine (rapports respectifs de 0,018 et 0,014), l'hydrolyse de la butyrylcholine est faible (tableau XXI). Elle représente environ 2 % de l'activité acétylcholinestérasique.

TABLEAU XXI

COMPARAISON DES HYDROLYSES DE L'ACÉTYLCHOLINE ET DE LA BUTYRYLCHOLINE PAR LE RECTUS DE GRENOUILLE ET PAR LES PORTIONS SUPERFICIELLE ET PROFONDE DU MUSCLE LATÉRAL DU POISSON-CHAT

Espèce	Muscles	Hydrolyse enzymatique Acétylcholine		Hydrolyse enzymatique Butyrylcholine		Rapports des dégage- ments BuCh ACh
		Relevée (1)	Calculée (1)	Relevée	Calculée (1)	
Grenouille.	Rectus.	91,1/60 mn	91,1	29,9 /60 mn	29,9	0,32
Poisson- chat.	Muscle latéral superficiel.	266,4/10 mn	1 598,4	29,9 /60 mn	29,9	0,018
	Muscle latéral profond.	155,1/10 mn	930,6	2,3 /10 mn 12,75/60 mn	13,2	0,014

(1) En raison des vitesses d'hydrolyse variables suivant les muscles et les substrats, les dégagements sont relevés à des temps différents, puis calculés pour une heure ($\mu\text{l CO}_2/0,2 \text{ g}$).
La dilution des préparations musculaires est de 1/15, soit 0,2 g de muscle par cupule. — Ach : 0,01 M; BuCh : 0,03 M.

2° *Inhibition des hydrolyses par le D. F. P.* — A la concentration de $1 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ de D. F. P., les inhibitions sont très voisines pour l'acétylcholine et la butyrylcholine (respectivement de 81,1 et 86,6 %).

A la concentration de $1 \cdot 10^{-7} \text{ M}$, l'hydrolyse de la butyrylcholine est inhibée de 41,2 %.

b) Etude pharmacologique.

Les conditions expérimentales sont celles décrites dans le paragraphe 1, page 399. Les essais d'inhibition par le D. F. P., la néostigmine et l'ésérine sont réalisés surtout sur le muscle superficiel; la gamme très étroite des concentrations actives de substances dépolarisantes a rendu malaisés les essais sur le muscle profond.

Muscle superficiel. — Nous avons vu dans le paragraphe 1 que la réponse de certaines préparations de muscle superficiel aux esters de la choline est non pas soutenue, comme celle toujours obtenue avec le ClK,

mais présente parfois un relâchement rapide. Lorsque le muscle est traité par un anticholinestérasique, la réponse aux esters de la choline devient plus soutenue et comparable à celle obtenue avec le ClK (fig. 22).

Les anticholinestérasiques modifient aussi la pente des courbes doses/action des esters de la choline (tableau XX). La différence est extrêmement nette avec l'acétylcholine (pente avant 0,31, après 1,28).

Le D. F. P., la néostigmine et l'ésérine potentialisent l'acétylcholine et la butyrylcholine, mais ne modifient pas l'action de l'amyltriméthyl-

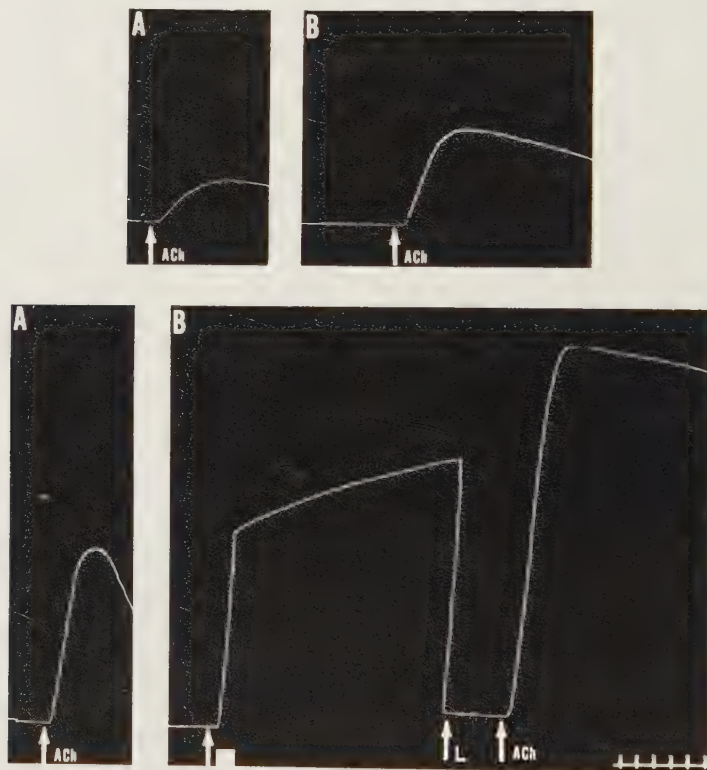


Fig. 22. — Muscle latéral superficiel du Poisson-chat. Sensibilisation à l'acétylcholine par le D. F. P.

Temps de contact du D. F. P. : 30 minutes.

Temps en 30 secondes.

↑ ACh, acétylcholine.

En haut :

A, acétylcholine 100 $\mu\text{g/ml}$.

B, après D. F. P. $1 \cdot 10^{-6}$ M, acétylcholine 20 $\mu\text{g/ml}$.

En bas :

A, acétylcholine 40 $\mu\text{g/ml}$.

B, après D. F. P., $1 \cdot 10^{-6}$ M, acétylcholine 1 $\mu\text{g/ml}$. Arrêt du cylindre enregistreur en ↓ ■ après administration du D. F. P. Le muscle est lavé en ↓ L. après 30 minutes de contact avec l'inhibiteur.

ammonium (tableau XXII) (fig. 24). La potentialisation maximale de la butyrylcholine est nettement inférieure à celle de l'acétylcholine. En particulier, à la concentration de $1 \cdot 10^{-5}$ M de D. F. P., la sensibilité à

FIG. 23.

Muscle latéral superficiel du Poisson-chat. Sensibilisation à la butyrylcholine par le D. F. P.

Temps de contact du D. F. P., 30 minutes.

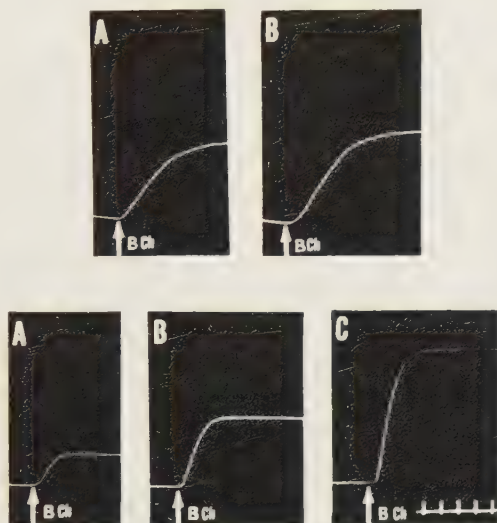
En haut, $\uparrow$ BCh, butyrylcholine 8 $\mu\text{g/ml}$:

en A, témoin; en B, après $1 \cdot 10^{-7}$ M de D. F. P.

En bas, $\uparrow$ BCh, 2 $\mu\text{g/ml}$:

en A, témoin; en B, après $1 \cdot 10^{-6}$ M de D. F. P.; en C, après $1 \cdot 10^{-5}$ M de D. F. P.

Temps en 30 secondes.



la butyrylcholine est seulement augmentée de 5 fois (rapports de doses), celle de l'acétylcholine de 100 fois (fig. 22, 23 et 24).

La potentialisation des deux esters de la choline survient à peu près

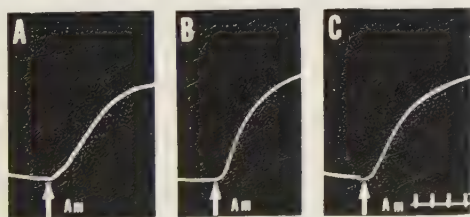


FIG. 24. Muscle latéral superficiel du Poisson-chat. Action du D. F. P. sur la sensibilité à l'amyltriméthylammonium.

$\uparrow$ Am : amyltriméthylammonium 4 $\mu\text{g/ml}$.

En A : témoin.

En B : après $1 \cdot 10^{-7}$ M de D. F. P.

En C : après $1 \cdot 10^{-5}$ M de D. F. P.

Temps en 30 secondes.

simultanément pour des concentrations de D. F. P. comprises entre $1 \cdot 10^{-7}$ M et $1 \cdot 10^{-6}$ M.

A partir de la concentration de $1 \cdot 10^{-5}$ M, le D. F. P. provoque lui-

même une contracture du muscle lorsque des esters de la choline ont été préalablement administrés. La contracture est toujours plus importante après l'acétylcholine (fig. 22) qu'après la butyrylcholine, cas où elle est parfois inexistante.

Muscle latéral profond. — L'ésérine, à la concentration de $1 \cdot 10^{-6}$ M, potentialise environ 20 fois l'action de l'acétylcholine, moins de 10 fois celle de la butyrylcholine. La sensibilité du muscle au ClK n'est pas modifiée (fig. 20).

TABLEAU XXII

ACTIONS DU D. F. P., DE LA NÉOSTIGMINE ET DE L'ESÉRINE
SUR LA SENSIBILITÉ DU MUSCLE LATÉRAL SUPERFICIEL DU POISSON-CHAT

Inhibiteur	Concentrations moléculaires	ACh	BuCh	KCl	AmT
D. F. P.	$1 \cdot 10^{-7}$	1	1		1
	$1 \cdot 10^{-6}$	2	2,5		
	$1 \cdot 10^{-6}$	>4	4		
	$1 \cdot 10^{-5}$	>10	4		
		>40	4		
		100	3	1	1
	$1 \cdot 10^{-4}$		4		1
			5		
Néostigmine.	$1 \cdot 10^{-6}$	8			
		4	2		
	$2 \cdot 10^{-6}$ (effet contracturant)	10	2		
Esérine.	$1 \cdot 10^{-6}$	≥ 20	>2		

Les potentialisations sont exprimées par les rapports R_D des doses donnant le même effet avant et après traitement du muscle par l'anticholinestérasique.

c) Localisation histochimique.

TECHNIQUE. — Nous avons utilisé, comme pour le rectus de Grenouille, la méthode de KOELLE et FRIEDENWALD. Le muscle latéral du Poisson-chat est fixé en immergeant le poisson dépouillé dans du formol neutralisé à 10 % pendant 45 minutes. Les deux portions du muscle sont réduites en coupes longitudinales de 35μ au microtome à congélation. Les conditions expérimentales sont celles décrites pour le rectus de Grenouille, en particulier, on a utilisé le tampon acide acétique-acétate de sodium de pH 5,5. Quelques déterminations ont été faites à pH 5,3. Les concentrations inhibitrices 50 % et sous-maximales sont calculées comme il a été dit antérieurement page 386.

La méthode de KOELLE et FRIEDENWALD met en évidence des activités cholinestérasiques à divers niveaux des fibres musculaires.

Dans le muscle superficiel, deux sortes de structures sont colorées : les jonctions neuro-musculaires, très nombreuses, réparties sur toute la surface des fibres (fig. 16), et les jonctions tendineuses, très digitées (fig. 25), qui marquent la limite entre deux myomères consécutifs (fig. 16).

Dans la zone superficielle du muscle latéral profond, on distingue, pour

FIG. 25.

Jonction musculo-tendineuse du muscle latéral superficiel du Poisson-chat.

Coupe longitudinale (fixation dans du formol neutralisé à 10 %, 30 minutes ; incubation avec l'acétylthiocholine, 15 minutes ; pH 5,3).

L'activité cholinestérasique est localisée le long des culs-de-sac que forme la membrane sarcoplasmique. La fibre musculaire est rattachée au myosepte par des fibrilles de collagène.



chaque fibre, une coloration au niveau de la jonction neuro-musculaire unique et au niveau de l'insertion (fig. 16.)

Dans la zone profonde du muscle latéral profond, aucune activité n'est visible en dehors de la région des myoseptes où sont localisées les activités des jonctions neuro-musculaires et musculo-tendineuses (fig. 16).

Muscle latéral superficiel.— Les jonctions neuro-musculaires et les insertions tendineuses sont colorées simultanément après environ 7 minutes d'incubation avec l'acétylthiocholine.

Aucune coloration nette n'apparaît à ces niveaux avec la butyrylthiocholine, même après des incubations de longue durée ; après 16 et 21 heures, une coloration diffuse est répartie sur toute la surface des fibres et ne permet aucune localisation précise. Le D. F. P. et le 3318 CT inhibent

au même degré l'activité acétylcholinestérasique à la jonction neuro-musculaire et à la jonction musculo-tendineuse. Les concentrations inhibitrices 50 % de D. F. P. et de 3318 CT sont respectivement de $5 \cdot 10^{-8}$ M et $7 \cdot 10^{-6}$ M; les concentrations inhibitrices sous-maximales de D. F. P. sont de $4 \cdot 10^{-7}$ M pour les jonctions neuro-musculaires et de $7 \cdot 10^{-7}$ M pour les insertions tendineuses (cette différence est dans la limite des erreurs expérimentales); celles de 3318 CT sont de $1 \cdot 10^{-3}$ M pour les deux niveaux (tableau XXIII).

Les inhibitions réalisées à pH 5,3 n'ont pas donné de résultats significativement différents (tableau XXIII).

TABLEAU XXIII

INHIBITION PAR LE D. F. P. ET LE 3318 CT DE L'HYDROLYSE DE L'ACÉTYLTHIOCHOLINE AUX JONCTIONS NEURO-MUSCULAIRES ET MUSCULO-TENDINEUSES DU MUSCLE LATÉRAL SUPERFICIEL DU POISSON-CHAT

Inhibiteurs	pH	Niveaux musculaires	Concentrations inhibitrices (moléculaires)	
			50 %	Sous-maximales
D. F. P.	5,5	J. N.	$5 \cdot 10^{-8}$	$4 \cdot 10^{-7}$
		J. T.	$5 \cdot 10^{-8}$	$7 \cdot 10^{-7}$
	5,3	J. N.	$4 \cdot 10^{-8}$	$1 \cdot 10^{-6}$
		J. T.	$4 \cdot 10^{-8}$	$1 \cdot 10^{-6}$
3318 CT	5,5	J. N.	$6 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-3}$
		J. T.	$7 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-3}$
	5,3	J. N.	$1 \cdot 10^{-5}$	$3 \cdot 10^{-4}$
		J. T.	$2 \cdot 10^{-5}$	$3 \cdot 10^{-4}$

J. N. : jonctions neuro-musculaires.
J. T. : jonctions musculo-tendineuses.

Muscle latéral profond. — Un essai réalisé à pH 5,3 avec l'acétylthiocholine montre que la coloration des myoseptes (où l'innervation est contiguë aux insertions tendineuses) apparaît après 15 minutes d'incubation. Elle est en retard par rapport à celle des jonctions neuro-musculaires et musculo-tendineuses du muscle superficiel (7 minutes).

La butyrylthiocholine est très lentement hydrolysée : après 6 heures d'incubation, on décèle seulement une coloration diffuse au niveau des myoseptes.

DISCUSSION

Les résultats les plus complets ont été obtenus sur le muscle superficiel. Ils font l'objet de la plus grande partie de cette discussion.

Les extraits de muscle superficiel hydrolysent *in vitro* les esters acé-

tique et butyrique de la choline, mais à des vitesses très différentes. L'hydrolyse de l'acétylcholine est environ 50 fois plus rapide que celle de la butyrylcholine.

En admettant que les substrats accèdent à tous les centres enzymatiques, on peut calculer, à partir des dégagements de CO_2 obtenus, *in vitro*, le temps théorique nécessaire à une préparation moyenne (800 mg) de muscle superficiel pour hydrolyser une dose active d'ester.

Dans ces conditions, une dose contracturante moyenne d'acétylcholine (2 mg dans 50 ml) peut être hydrolysée en environ 2 minutes 20 secondes. La concentration de l'acétylcholine peut donc être fortement réduite pendant le temps de la contraction.

Par contre, la fraction de butyrylcholine qui peut être hydrolysée est beaucoup plus faible puisqu'il faut environ 22 minutes pour qu'une dose contracturante moyenne (400 μg) soit inactivée (tableau XXIV).

TABLEAU XXIV

TEMPS THÉORIQUEMENT NÉCESSAIRES
À L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE DES DOSES ACTIVES D'ESTERS DE LA CHOLINE
SUR LE MUSCLE LATÉRAL SUPERFICIEL DU POISSON-CHAT

Doses actives moyennes (1)	Hydrolyse <i>in vitro</i> par minute par 800 mg de muscle (2)	Temps nécessaire à l'hydrolyse des doses actives
Chlorure d'acétylcholine : 2 mg = $1,1 \times 10^{-5}$ mol. ...	106,4 μl CO_2 = $4,7 \cdot 10^{-6}$ mol.	2 mn 20 sec.
Chlorure de butyrylcholine : 0,4 mg = $1,9 \cdot 10^{-6}$ mol. ...	2 μl CO_2 = $0,89 \cdot 10^{-7}$ mol.	22 mn
(1) Pour une préparation de 800 mg. (2) Dégagements obtenus pour 200 mg de muscle $\times 4$.		

On pouvait donc s'attendre à ce que la potentialisation de la butyrylcholine soit faible. C'est ce que nous avons observé : la potentialisation de cet ester, exprimée par le rapport des doses (R_D), est approximativement de 5 alors qu'elle est de 100 pour l'acétylcholine. Ces valeurs correspondent, en gros, aux vitesses d'hydrolyse respectives de ces deux esters (29,9/0,2 g par heure pour la butyrylcholine et 1598,4/0,2 g par heure pour l'acétylcholine).

En outre, la potentialisation suit l'inhibition : à la concentration de $1 \cdot 10^{-7}$ M de D.F.P., pour laquelle l'inhibition des cholinestérases est inférieure à 50 %, la potentialisation des deux esters est liminaire.

Enfin, aucune sensibilisation du muscle à des substances non hydrolysables n'a été décelée.

Ces trois faits montrent que les sensibilisations du muscle latéral superficiel aux esters de la choline sont surtout d'origine enzymatique, comme celles du rectus de Grenouille.

On remarquera, en outre, que le rapport de potentialisation maximum de la butyrylcholine ($R_D = 5$) est très semblable à celui obtenu pour le rectus de Grenouille; il correspond pour les deux muscles à une hydrolyse enzymatique du même ordre de grandeur ($\approx 29,9/0,2$ g par heure).

Contrairement à ce qui a été observé pour le rectus, les effets du D. F. P. ne permettent pas d'attribuer à deux enzymes différents les hydrolyses de l'acétylcholine et de la butyrylcholine. En effet, les inhibitions *in vitro* et les potentialisations *in vivo* apparaissent simultanément et progressent de la même façon pour les deux esters : les CI 50 sont d'environ $1 \cdot 10^{-7}$ M, et la concentration potentialisant de façon sous-maximale les deux esters, de $1 \cdot 10^{-6}$ M.

Cette absence de spécificité du D. F. P. peut s'expliquer de deux façons :

— ou bien l'enzyme responsable de l'hydrolyse de la butyrylcholine est une butyrylcholinestérase dont la sensibilité au D. F. P. serait faible; de tels enzymes existent, selon ORD et THOMPSON (1950), dans certains organes du Rat et, selon KOELLE (1955), chez le Lapin (mais non chez le Chat);

— ou bien l'hydrolyse de la butyrylcholine est assurée par l'acétylcholinestérase dont l'activité est particulièrement intense dans le muscle latéral : nous avons vu en effet dans l'introduction que la spécificité d'un enzyme pour un substrat est relative et qu'elle correspond seulement à son hydrolyse préférentielle.

Les expériences réalisées sur les muscles du Poisson-chat ne permettent pas d'opter pour l'une ou l'autre hypothèse; les résultats obtenus sur les organes électriques du Malaptérure et du Gnathonemus et discutés dans le chapitre suivant permettront, sinon une conclusion, du moins un choix préférentiel.

L'étude histochimique montre que l'activité acétylcholinestérasique est aussi importante au niveau des jonctions neuro-musculaires qu'au niveau des insertions tendineuses, puisque la coloration avec l'acétylthiocholine y apparaît simultanément. Elle est plus importante que dans le rectus de Grenouille; les temps seuils de visualisation sont en effet de 7 mn au lieu de 10-15 et 30-45 mn. Par contre, l'hydrolyse de la butyrylthiocholine n'a pu être localisée; aucune coloration précise n'est apparue, même après des temps d'incubation très longs.

Cette absence de visualisation contraste avec les localisations observées dans le rectus de Grenouille; ceci est d'autant plus remarquable que les hydrolyses de la butyrylcholine par des broyats et les sensibilisations maximales à cet ester par le D. F. P. sont pratiquement les mêmes (hydrolyses $\approx 29,9$; potentialisations ≈ 5). C'est donc la répartition de l'activité qui différencie les deux muscles. On est tenté d'émettre l'hypothèse qu'une

fraction importante de l'activité dosée dans les broyats du muscle superficiel est localisée dans les régions purement aneures. En effet, Srou (1955) a montré, sur le muscle latéral d'un autre Téléostéen, l'Anguille, que l'activité cholinestérasique aneurale est beaucoup plus intense dans ce muscle que dans les zones aneures des muscles d'autres Vertébrés où des dosages ont pu être pratiqués.

Le système cholinestérasique du muscle latéral profond est très semblable à celui du muscle latéral superficiel : l'hydrolyse de la butyrylcholine est environ 60 fois plus faible que celle de l'acétylcholine. L'activité cholinestérasique globale est cependant nettement inférieure; elle représente environ 58 % de l'activité cholinestérasique du muscle superficiel. Comme pour celui-ci, la potentialisation de l'acétylcholine est plus importante que celle de la butyrylcholine.

B. — ORGANES ÉLECTRIQUES

On sait que l'activité cholinestérasique des organes électriques est supérieure à celle de tous les tissus étudiés jusqu'à maintenant, et qu'elle est attribuée à une acétylcholinestérase (NACHMANSOHN et ROTHENBERG, 1945). C'est d'ailleurs à partir des organes électriques de la Torpille et du Gymnote que ROTHENBERG et NACHMANSOHN (1947) ont préparé des extraits très purifiés d'acétylcholinestérase.

AUGUSTINSSON (1955) a montré que l'activité cholinestérasique varie beaucoup suivant l'origine du matériel; elle est en particulier 100 fois plus faible chez le Malaptérure que chez la Torpille (AUGUSTINSSON et JOHNELS, 1958).

Nous avons comparé l'activité cholinestérasique des organes électriques de deux Poissons téléostéens appartenant à des types différents : le Malaptérure, du type Siluridé, est le Poisson-chat électrique, le Gnathonemus appartient au type des Mormyridés. L'origine phylogénétique, longtemps discutée dans le cas du Malaptérure, est dans les deux cas musculaire (JOHNELS, 1956). SZABO (1957) a montré que l'organe électrique du Gnathonemus se développe à partir de la portion profonde du muscle latéral et qu'il appartient au système moteur rapide.

Nous avons en particulier recherché, comme pour les muscles, dans quelle mesure les extraits de ces organes hydrolysent l'acétylcholine et la butyrylcholine, si ces hydrolyses sont attribuables à des enzymes différents et s'il existe d'autres localisations cholinestérasiques que celles des synapses. En effet, après COUCEIRA, ALMEIDA et FREIRE (1955), qui ont localisé l'activité acétylcholinestérasique au niveau de la face innervée de l'électroplaque du Gymnote, COUTEAUX et SZABO (1959) ont mis en évidence une localisation purement aneurale dans l'organe électrique du Gnathonemus.

1° ACTIVITÉ CHOLINESTÉRASIQUE

Les conditions de dosage par la méthode manométrique de Warburg-Ammon sont celles du rectus de Grenouille et du muscle latéral du Poisson-chat, sauf celle de la dilution des extraits qui varie suivant l'activité de 1/15 à 1/170. Les résultats sont calculés pour 0,2 g par heure.

TABLEAU XXV

HYDROLYSE DE L'ACÉTYLCHOLINE ET DE LA BUTYRYLCHOLINE
PAR LES ORGANES ÉLECTRIQUES DU GNATHONEMUS ET DU MALAPTÉRURE

	Hydrolyse de l'ACH en $\mu\text{l CO}_2/0,2 \text{ g}$ par heure	Hydrolyse de la BuCh en $\mu\text{l CO}_2/0,2 \text{ g}$ par heure	Rapport BuCh/Ach
Gnathonemus	5 096	115,2	0,022
Malaptérure	1 156	31,5	0,027

L'acétylcholine est hydrolysée très rapidement par les deux organes électriques; l'hydrolyse est cependant plus importante pour l'organe du Gnathonemus (5 096 $\mu\text{l CO}_2/0,2 \text{ g}$ par heure) que pour celui du Malaptérure (1 156 $\mu\text{l CO}_2/0,2 \text{ g}$ par heure) (tableau XXV). Les résultats, en ce qui concerne le Malaptérure, sont du même ordre de grandeur que ceux obtenus par AUGUSTINSSON et JOHNELS (1958).

L'hydrolyse de la butyrylcholine est nettement moins rapide. Elle est pour les deux organes électriques environ 40 fois plus faible.

2° INHIBITION PAR LES ANTICHOLINESTÉRASIQUES

Pour préciser la nature des enzymes intervenant dans l'hydrolyse de l'acétylcholine et de la butyrylcholine, nous avons recherché dans quelle mesure ces hydrolyses sont affectées par le D. F. P. et le Mipafox. Cette étude a été limitée à des concentrations qui inhibent sélectivement les butyrylcholinestérases d'autres matériels (1 . 10⁻⁷ M de D. F. P. pour le rectus de Grenouille; 4 . 10⁻⁶ M de Mipafox pour le sérum humain (HOLMSTEDT, 1957 a).

Le D. F. P. et le Mipafox n'inhibent pas spécifiquement l'hydrolyse de la butyrylcholine par les broyats des deux organes électriques; pour l'acétylcholine et la butyrylcholine, les pourcentages d'inhibition par le D. F. P. sont en effet très semblables (tableau XXVI).

Le Mipafox, plus spécifique des butyrylcholinestérases que le D. F. P., n'inhibe pas, même à la concentration de 4 . 10⁻⁵ M, l'hydrolyse des deux substrats.

TABLEAU XXVI

INHIBITION PAR LE D. F. P.
DE L'HYDROLYSE DE L'ACÉTYLCHOLINE ET DE LA BUTYRYLCHOLINE
PAR LES ORGANES ÉLECTRIQUES DE GNATHONEMUS ET DE MALAPTÉRURE

Concentrations moléculaires des inhibiteurs	Malaptérure		Gnathonemus	
	ACh	BuCh	ACh	BuCh
<i>D. F. P.</i>				
$1 \cdot 10^{-4}$ M	99,9 (1)			
$1 \cdot 10^{-6}$ M	99			
$1 \cdot 10^{-7}$ M	35,6	16,8	26,8	21,8
<i>Mipafox</i>				
$4 \cdot 10^{-5}$ M	0			
$4 \cdot 10^{-6}$ M	4	2		
$1 \cdot 10^{-7}$ M		2		
(1) Inhibition en %.				

3° LOCALISATION DE L'ACTIVITÉ CHOLINESTÉRASIQUE

La localisation très précise de la zone synaptique de l'organe électrique de *Gnathonemus*, qui s'étend sur la face interne suivant une ligne médiane, permet de prélever de part et d'autre de cette zone une portion réellement aneurale de l'organe. Des dosages d'activité cholinestérasique sont réalisés sur cette portion aneurale pure et sur la portion synaptique comportant aussi une grande partie aneurale.

Des dégagements très semblables sont obtenus pour la portion aneurale pure et la portion contenant les synapses avec l'acétylcholine (12 433 et 12 036 μ l CO_2 /0,2 g par heure) et avec la butyrylcholine (128 et 133 μ l CO_2 /0,2 g par heure).

Les résultats histochimiques corroborent les résultats biochimiques. Les régions synaptiques et les pédicules, dénués d'éléments nerveux, de l'organe électrique de *Gnathonemus*, préalablement fixé pendant 30 minutes dans du formol neutralisé, sont fortement colorés tous deux après 5 minutes d'incubation avec l'acétylthiocholine. Pour la butyrylthiocholine, les temps seuils de visualisation sont de 1 heure pour les deux localisations.

L'activité cholinestérasique aneurale est moins importante dans l'organe électrique du *Malaptérure*. Les jonctions synaptiques sont colorées après 10 minutes d'incubation avec l'acétylthiocholine, les pédicules seulement après 30 minutes. Aucune coloration précise n'est mise en évidence dans cet organe avec la butyrylthiocholine.

C. — DISCUSSION

Le système cholinestérasique des organes électriques se caractérise comme celui du muscle latéral du Poisson-chat par une hydrolyse importante de l'acétylcholine et par une hydrolyse beaucoup plus faible (environ 40 fois) de la butyrylcholine.

Il est intéressant de remarquer que l'activité cholinestérasique de l'organe électrique de Malaptérure est plus faible que celle de l'organe de *Gnathonemus*; elle est très semblable à celle du muscle profond du Poisson-chat dont il est l'équivalent.

Comme pour le muscle latéral du Poisson-chat, l'hydrolyse de la butyrylcholine n'est pas inhibée spécifiquement par les faibles doses de D. F. P., et elle ne l'est pas par des concentrations déjà élevées de Mipafox qui sont considérées comme sélectives des butyrylcholinestéras.

Dans le chapitre précédent, nous avons émis deux hypothèses pour expliquer l'inhibition non spécifique de l'hydrolyse de la butyrylcholine par le D. F. P. Il devient très difficile, avec les résultats obtenus sur les organes électriques, de considérer comme une butyrylcholinestérase un enzyme qui n'est pas inhibé de façon sélective par deux inhibiteurs (et non plus un seul) des butyrylcholinestéras. La deuxième hypothèse émise, celle de l'intervention de l'*acétylcholinestérase* dans l'hydrolyse de la *butyrylcholine*, apparaît plus plausible. Deux arguments plaident en sa faveur : l'hydrolyse des deux substrats est inhibée simultanément par les fortes doses de D. F. P.; en outre, pour les deux muscles du Poisson-chat et les deux organes électriques étudiés, la vitesse d'hydrolyse de la butyrylcholine représente chaque fois le 1/50 de celle de l'acétylcholine. Ceci serait un exemple du caractère seulement préférentiel de l'acétylcholinestérase pour l'acétylcholine, défendu par STURGE et WHITTAKER (1950), MOUNTER et WHITTAKER (1950).

L'activité cholinestérasique dans les organes électriques est, comme dans les muscles du Poisson-chat, synaptique et aneurale. Cette activité aneurale a été mise en évidence de deux façons sur l'organe électrique du *Gnathonemus* :

— par des dosages biochimiques qui montrent que dans la région aneurale pédiculaire, l'activité cholinestérasique est très importante et voisine de celle dosée dans la région synaptique;

— par la détection histochimique : la coloration diffuse dans les pédicules apparaît en même temps que celle des synapses avec l'acétylthiocholine et la butyrylthiocholine. Etant donné la grande surface d'observation, l'activité aneurale diffuse correspond probablement à une quantité d'enzyme plus grande que l'activité purement synaptique.

En outre, une coloration aneurale, mais nettement localisée, est obtenue à un niveau aneurale, à la jonction électroplaque-pédicule. Cette localisation a déjà été signalée par COUTEAUX et SZABO (1959).

L'activité aneurale diffuse dans les pédicules de l'organe électrique de Malaptérure est moins importante : avec l'acétylthiocholine, elle apparaît après la coloration des synapses; elle n'est pas mise en évidence avec la butyrylthiocholine.

Ainsi, le système cholinestérasique de l'organe électrique, dont l'origine est musculaire, est très voisin de celui des muscles de Poisson. Il paraît même être identique ou extrêmement voisin dans l'organe électrique du Malaptérure et le muscle profond du Poisson-chat. En outre, dans les deux tissus, muscle et organe électrique, on ne peut mettre en évidence d'action butyrylcholinestérasique typique.

Il est intéressant de remarquer l'évolution du système cholinestérasique aneurale dans les divers organes étudiés :

Dans le rectus de Grenouille, la présence d'une activité cholinestérasique de nature aneurale « diffuse » a été admise seulement à titre hypothétique pour expliquer des écarts observés dans les résultats des diverses méthodes. Elle ne peut être que faible.

Dans les muscles du Poisson-chat, le recoupement entre les techniques a amené nécessairement à établir l'existence d'une activité aneurale « diffuse », puisque l'hydrolyse non négligeable de la butyrylcholine par les broyats de ce muscle ne peut être détectée histochimiquement aux jonctions neuro-musculaires et musculo-tendineuses.

Dans les organes électriques, par contre, une activité cholinestérasique aneurale « diffuse » a été dosée dans les broyats et détectée *in situ*.

Il apparaît donc que pour ces divers organes, l'activité diffuse est d'autant plus intense que l'activité cholinestérasique est plus grande. Elle croît dans le sens : Grenouille, Poisson-chat, Malaptérure, Gnathonemus.

Les méthodes utilisées n'ont pas permis de préciser si dans les muscles les cholinestérases aneurales « diffuses » sont liées à la myosine (KOVER et coll., 1957) ou à la membrane sarcoplasmique. Cette dernière hypothèse apparaît vraisemblable puisque les appareils « sous-neural » et « tendineux » — où siège la plus grande partie de l'activité cholinestérasique du muscle — sont eux-mêmes constitués de replis sarcoplasmiques (COUTEAUX, 1955).

V. — MUSCLES DE MAMMIFÈRES

Comme chez la Grenouille et le Poisson, il existe deux systèmes musculaires chez les Mammifères. Cependant, seules les fibres des fuseaux neuromusculaires présentent les caractéristiques du système « lent ». Les fibres extra-fusales, qui sont les plus nombreuses, sont toutes « rapides » (KUFFLER, HUNT et QUILLIAM, 1951). Elles se distinguent des fibres intra-fusales par leur calibre, leur innervation, la nature de leurs jonctions neuro-musculaires et la propagation de l'influx.

L'existence de deux sortes de muscles, se caractérisant en particulier par la couleur de leurs fibres et la vitesse de leur réponse, a amené à la distinction de deux types de fibres à l'intérieur du système rapide.

KÜHNE (1865) et RANVIER (1873) puis PRENANT (1912) ont été les premiers à différencier les « muscles rouges » des « muscles blancs ». A cette distinction anatomique, on a par la suite associé des différences fonctionnelles : les « muscles rouges » se contractent plus lentement que les « muscles blancs » (DENNY BROWN, 1929); les deux types de muscles se distinguent aussi par leur chronaxie (BOURGUIGNON, 1947; BOURGUIGNON et HUMBERT, 1947).

L'exemple le plus classique est l'opposition entre le tibial antérieur et le soléaire. Le tibial antérieur est un muscle fléchisseur blanc à contraction rapide, téтанisable uniquement par les stimulations de grandes fréquences; le soléaire est un extenseur de couleur rouge se contractant plus lentement et dont les réponses fusionnent rapidement en un téтанos.

Les différences qui peuvent exister d'un muscle à l'autre ne sont pas en général de nature qualitative. Le soléaire, muscle « rouge lent », est innervé par les fibres dont le calibre est, en moyenne, égal à 78 % de celui des axones innervant le gastrocnémien, muscle « blanc rapide ».

La proportionnalité, déjà signalée entre le diamètre de l'axone et sa vitesse de conduction (HURSH, 1939; RUSHTON, 1951), est confirmée dans ce cas (ECCLES, ECCLES et LUNDBERG, 1957). Cependant, suivant FERNAND et YOUNG (1951), il n'existe pas de relation entre la couleur des fibres musculaires ou la rapidité de leur contraction et le calibre des fibres nerveuses les innervant. Suivant ces auteurs, le faible diamètre des fibres innervant le soléaire résulte de leur formation plus tardive au cours du développement embryonnaire.

La distinction entre les muscles « rouges lents » et les muscles « blancs rapides » correspond à des caractéristiques fonctionnelles différentes de leurs motoneurones respectifs.

GRANIT, HENATSCH et STEG (1956) ont en effet distingué dans la partie antérieure de la moelle épinière du Chat des cellules de type tonique et des cellules de type phasique. ECCLES, ECCLES et LUNDBERG (1957) ont montré, par ailleurs, que les motoneurones innervant les muscles « rouges lents » présentent une hyperpolarisation après stimulation, de durée nettement plus longue que les motoneurones innervant les muscles « pâles rapides ». Ils pensent que ces deux groupes de motoneurones s'identifient aux groupes « toniques » et « phasiques » de GRANIT. Par des expériences de nerfs croisés, BULLER, ECCLES et ECCLES (1960) ont montré que les motoneurones déterminent la rapidité de réponse des muscles.

Nous avons limité notre étude du système cholinestérasique des muscles de Mammifères à la comparaison de l'activité cholinestérasique des muscles « rouges lents » et des muscles « blancs rapides ».

L'hydrolyse de l'acétylcholine et de la butyrylcholine a été déterminée par la méthode biochimique, sur des broyats de :

— muscles « rouges lents » : diaphragme du Cobaye, du Rat, du Chat et du Lapin, soléaire du Chat;

— muscles « blancs rapides » jumeaux du Rat, du Lapin, tibial antérieur du Chat.

La répartition des cholinestérases a été étudiée par les méthodes biochimique et histochimique dans le diaphragme du Rat et du Cobaye.

En outre, nous avons étudié histochimiquement certains muscles du Singe Cynocéphale pour vérifier si des systèmes cholinestérasiques différents peuvent être mis en relation avec des caractéristiques fonctionnelles comme l'a observé HÄGGQVIST (1960) chez le Singe Rhésus.

A. — ÉTUDE BIOCHIMIQUE

Les conditions expérimentales sont celles du rectus de Grenouille et des muscles de Poisson; la dilution terminale des extraits musculaires est de 1/15, soit 0,2 g de muscle par cupule. Dans quelques cas, notamment pour les essais sur le diaphragme du Cobaye et les muscles du Chat, les prélèvements sont faits sur l'animal perfusé avec du sérum physiologique à 9/1 000 : le liquide est introduit par la veine jugulaire et recueilli à la carotide jusqu'à ce qu'il ne soit plus teinté de sang.

L'hydrolyse de l'acétylcholine varie d'un muscle à l'autre (tabl. XXVII). Elle est notamment plus importante dans chaque espèce animale pour le

TABLEAU XXVII

HYDROLYSE DE L'ACÉTYLCHOLINE ET DE LA BUTYRYLCHOLINE
PAR LES MUSCLES DE MAMMIFÈRES

Espèces animales	Muscles	Hydrolyse de l'acétylcholine (par heure $\mu\text{CO}_2/0,2 \text{ g}$)	Hydrolyse de la butyrylcholine	
			$\mu\text{CO}_2/0,2 \text{ g}$ par heure	en % de l'hyd. de l'ACh
Cobaye	Diaphragme.	116,5	106,9	91,7
Rat	Jumeaux.	74,5	22,7	30,4
	Diaphragme.	119,2	69,9	58,6
Chat	Tibial antérieur.	57,6	8,5	14,7
	Soléaire.	71,7	25,2	35,1
	Diaphragme.	115,3	66,6	58,6
Lapin	Jumeaux.	36,4	17,5	48
	Diaphragme.	74,3	35,3	47,5

diaphragme ou le soléaire que pour les jumeaux ou le tibial antérieur. Ainsi, chez le Chat, elle est de 115,3 μ l de CO₂/1 h/0,2 g pour le diaphragme, de 71,7 pour le soléaire et de 57,6 pour le tibial antérieur.

L'hydrolyse de la butyrylcholine est, dans tous les cas, plus faible que celle de l'acétylcholine mais varie, comme elle, d'un muscle à l'autre : elle est constamment beaucoup plus grande dans les muscles rouges que dans les muscles blancs. En outre, si on exprime en pourcentage l'hydrolyse de la butyrylcholine par rapport à celle de l'acétylcholine, le pourcentage est lui-même d'autant plus élevé que l'activité acétylcholinestérase est plus importante. Le cas du Lapin fait exception : si l'hydrolyse de la butyrylcholine est aussi nettement plus importante dans le diaphragme que dans les jumeaux, elle représente cependant dans ces deux muscles, contrairement aux autres espèces étudiées, un pourcentage semblable de l'hydrolyse de l'acétylcholine.

L'hydrolyse de la butyrylcholine par les broyats de diaphragme de Cobaye est inhibée par les faibles doses de D. F. P., spécifiques des butyrylcholinestérases. Aux concentrations de $1 \cdot 10^{-7}$ M et $1 \cdot 10^{-6}$ M, l'hydrolyse de cet ester est en effet réduite de 90 %.

B. — ÉTUDE DE LA RÉPARTITION DES CHOLINESTÉRASES

Elle a été réalisée de deux façons : par dosages biochimiques sur des portions différentes de muscles et par la recherche histochimique des localisations.

a) ÉTUDE BIOCHIMIQUE

Nous avons comparé l'hydrolyse de l'acétylcholine et de la butyrylcholine par des portions médianes (contenant les synapses) et des portions périphériques (aneurales, non tendineuses) de diaphragme du Rat.

L'hydrolyse de la butyrylcholine représente 47 % de l'hydrolyse de l'acétylcholine pour la portion médiane synaptique et 75 % pour la portion périphérique aneurale.

b) ÉTUDE HISTOCHIMIQUE

Au niveau des jonctions neuro-musculaires des *diaphragmes du Rat et du Cobaye*, les temps seuils de visualisation sont approximativement dix fois plus courts pour l'acétylthiocholine (environ 10 minutes) que pour la butyrylthiocholine (environ 2 heures). Les résultats histochimiques ne rendent donc pas compte de l'hydrolyse importante de la butyrylcholine observée avec la méthode biochimique sur des broyats de muscles.

Des colorations diffuses sont observées tout le long des fibres musculaires après incubation prolongée avec l'acétylthiocholine; elles plaident en faveur d'une activité cholinestérasique aneurale diffuse importante.

Muscles du Singe cynocéphale. — Les plaques motrices des muscles de l'œil (droit externe, droit inférieur) sont fortement colorées après 15 minutes d'incubation avec l'acétylthiocholine. La coloration est par contre, pour ce temps d'incubation, liminaire au niveau des plaques motrices des muscles buccinateur, triangulaire des lèvres, du sphincter externe de l'anus, et elle n'apparaît qu'après 30 minutes au niveau du muscle occipital.

Les colorations avec la butyrylthiocholine sont toujours plus tardives. Mais des différences sont aussi observées entre les divers muscles. Ainsi, les colorations sont plus précoces (30 minutes) pour les muscles de l'œil et le muscle buccinateur que pour les muscles occipital et anal (2 heures).

La coloration avec la butyrylthiocholine n'apparaît pas lorsque les coupes de muscle occipital ont été soumises auparavant à des concentrations de Mipafox ($1 \cdot 10^{-6}$ M et $4 \cdot 10^{-6}$ M) inhibant totalement les butyrylcholinestérases sans affecter les acétylcholinestérases (HOLMSTEDT, 1957 a); par contre, les colorations avec l'acétylthiocholine ne sont pas supprimées par ces même concentrations de Milafox.

C. — DISCUSSION

Tous les muscles de Mammifères hydrolysent l'acétylcholine et la butyrylcholine, mais à des vitesses différentes.

Dans le cas étudié du diaphragme de Cobaye, l'hydrolyse de la butyrylcholine peut être attribuée à une butyrylcholinestérase puisqu'elle est inhibée par les faibles concentrations de D. F. P.

La comparaison des activités cholinestérasiques des différents muscles de Mammifères montre que :

— pour des muscles comparables, les vitesses d'hydrolyse de l'acétylcholine et de la butyrylcholine ne sont pas significativement différentes d'une espèce animale à l'autre;

— des écarts significatifs sont observés pour les divers muscles d'un même animal.

— les muscles rouges (diaphragme, soléaire) hydrolysent plus rapidement l'acétylcholine et la butyrylcholine que les muscles blancs (jumeaux, tibial antérieur).

— rapportée à celle de l'acétylcholine, l'hydrolyse de la butyrylcholine est plus importante pour les muscles rouges que pour les muscles blancs; chez le Cobaye, notamment, l'hydrolyse de la butyrylcholine est parfois très voisine de celle de l'acétylcholine.

Il existe donc une différenciation enzymologique nette entre les deux

espèces de muscles fonctionnellement différents. La signification en est encore obscure. Elle rappelle, sans que l'on puisse établir de relation intime, la différenciation pharmacologique établie pour la première fois par PATON et ZAIMIS (1949 et 1951). Ces auteurs, ainsi que JEWELL et ZAIMIS (1953 et 1954), ont montré que le soléaire et les muscles de la respiration (diaphragme et muscles intercostaux) sont déprimés de façon simultanée par le décaméthonium et la d-tubocurarine, qu'ils sont, en outre, plus sensibles au décaméthonium mais moins sensibles à la d-tubocurarine que le tibial antérieur. BOWMAN et ZAIMIS (1958) ont montré par ailleurs que les doses physiologiques d'adrénaline diminuent la tension du soléaire, tandis qu'elles sont sans action sur le tibial antérieur.

Il semble exister une correspondance entre le système enzymatique des fibres musculaires et celui de leur motoneurone respectif : GIACOBINI et HOLMSTEDT (1958), GIACOBINI (1959) ont en effet observé que les cellules de la moelle antérieure du Rat peuvent être classées en deux catégories suivant leur activité cholinestérasique. La moyenne de l'activité acétylcholinestérasique par cellule, est, pour la première, de $1,63 \pm 0,129 \times 10^{-3} \mu\text{l CO}_2/\text{heure}$, et pour la seconde de $7 \pm 0,324 \times 10^{-3} \mu\text{l CO}_2/\text{heure}$. Les cellules à plus forte activité innervent les muscles extenseurs. D'autre part, contrairement aux cellules des ganglions sympathiques et spinaux, toutes les cellules de la corne antérieure présentent une activité butyrylcholinestérasique. HOLMSTEDT et SKOGLUND (1953) ont montré, comme nous l'avons observé pour les muscles, que cette activité est plus importante dans les cellules innervant les muscles extenseurs que dans celles innervant les muscles fléchisseurs. L'activité des premières est en effet plus sensible à l'action inhibitrice du D. F. P.

En plus de la coloration classique au niveau des synapses, nous avons observé, après une incubation prolongée avec l'acétylthiocholine, une coloration diffuse sur toute la longueur des fibres du diaphragme du Cobaye. Il s'agit vraisemblablement d'une activité aneurale « diffuse ».

En effet, nous avons relevé un écart important entre l'activité butyrylcholinestérasique relative déterminée, d'une part, par la méthode biochimique sur des broyats, d'autre part, par la méthode histochimique, au niveau des synapses. Contrairement aux muscles du Poisson, cette activité serait donc surtout de nature butyrylcholinestérasique. DENZ (1954) était parvenu pour le diaphragme de Rat à une conclusion semblable.

VI. — CONCLUSION

Lorsque nous avons abordé ce travail, les caractéristiques du système cholinestérasique du muscle strié faisaient encore l'objet de nombreuses discussions. S'il était reconnu généralement que ce système est représenté presque exclusivement par une acétylcholinestérase, la présence d'une

butyrylcholinestérase n'était pas toujours admise. Nous avons déduit des données de la littérature que les divergences résultaient, d'une part, de l'existence de variations à travers les espèces animales, d'autre part, de l'utilisation de méthodes diverses, biochimiques, pharmacologiques et histochimiques dont le principe est fondamentalement différent. En effet, si ces techniques contribuent toutes trois à la caractérisation des enzymes, elles rendent compte cependant de phénomènes différents : la méthode biochimique permet de doser l'activité cholinestérasique moyenne; la méthode pharmacologique d'identifier les enzymes intervenant dans l'hydrolyse *in vivo* des esters de la choline en apport exogène; la méthode histochimique de déterminer des activités localisées au niveau des différentes formations musculaires.

Pour préciser la nature, la localisation et le rôle de ces enzymes dans le muscle, nous avons entrepris l'étude du système cholinestérasique de muscles d'animaux appartenant à trois classes de vertébrés, en utilisant conjointement les techniques des trois ordres.

Pour chacune des méthodes, l'identification des enzymes a été réalisée par l'emploi de substrats différents et d'anticholinestérasiques permettant de bloquer à volonté la totalité des cholinestérases ou préférentiellement l'un des deux types d'enzymes.

Nous avons acquis de nouvelles données concernant :

1° Les variations des activités cholinestérasiques dans les diverses espèces animales étudiées.

2° La répartition des cholinestérases aux différents niveaux des fibres musculaires.

3° L'intervention des deux types d'enzymes dans les conditions pharmacologiques.

En outre, sur la base de nos résultats, il est permis d'émettre des hypothèses sur le rôle de ces enzymes dans les conditions physiologiques.

1° VARIATIONS DES ACTIVITÉS CHOLINESTÉRASIQUES

Le bilan récapitulatif des activités cholinestérasiques observées avec la technique manométrique de Warburg-Ammon sur broyats de muscle (tableau XXVIII) conduit à constater, en premier lieu, *des différences importantes entre les diverses classes de vertébrés*. Ces différences concernent :

— *Les activités.* — L'activité cholinestérasique est nettement plus importante dans les muscles de Poissons et dans les organes électriques que dans les muscles de la Grenouille et de Mammifères.

TABLEAU XXVIII

HYDROLYSE DE L'ACÉTYLCHOLINE ET DE LA BUTYRYLCHOLINE PAR LES MUSCLES DE POISSONS, BATRACIENS ET MAMMIFÈRES

Espèces animales	Muscles	Hydrolyse de l'ACH $\mu\text{ACO}_2/1 \text{ H}_2\text{O}, 2 \text{ g}$	Hydrolyse de la BuCh $\mu\text{ACO}_2/1 \text{ H}_2\text{O}, 2 \text{ g}$	Hydrolyse relative de la butyrylcholine par rapport à l'hydrolyse de l'acétylcholine (en %)
<i>Poissons :</i>				
Poisson-chat	Muscle latéral superficiel.	1 598,4	29,9	1,8
	Muscle latéral profond.	930,6	13,2	1,4
Gnathonemus	Organe électrique.	5 096	115,2	2,8
Malaptérure	Organe électrique.	1 156,2	31,5	2,6
<i>Batraciens :</i>				
Grenouille	Muscle droit abdominal (rectus).	91,1	29,9	32
<i>Mammifères :</i>				
Cobaye	Diaphragme.	116,5	106,9	91,7
Rat	Jumeaux.	74,5	22,7	30,4
	Diaphragme.	119,2	69,9	58,6
Chat	Tibial antérieur.	57,6	8,5	14,7
	Soléaire.	71,7	25,2	35,1
	Diaphragme.	115,3	66,6	58,6
Lapin	Jumeaux.	36,4	17,5	48
	Diaphragme.	74,3	35,3	47

— *La nature du système cholinestérasique.* — Chez les Poissons, le système cholinestérasique est représenté, pratiquement en totalité, par une acétylcholinestérase. Aucun de nos essais ne nous a permis de mettre en évidence une butyrylcholinestérase. Chez la Grenouille et les Mammifères, il est représenté par une acétylcholinestérase et une butyrylcholinestérase.

L'acétylcholinestérase des muscles de Poissons étudiés se distingue de celle des muscles de la Grenouille par sa sensibilité à l'action inhibitrice du D. F. P. LUNDIN (1959) avait observé une sensibilité semblable du muscle de Poisson rouge. Cette particularité de l'acétylcholinestérase du Poisson est à rapprocher de certaines différences déjà signalées : SIOW (1955) a en effet montré que l'acétylcholinestérase des muscles de l'Anguille se distingue de celle des érythrocytes du Bœuf par un coefficient hydrolytique de l'acétylcholine et de l'acétyl- β -méthylcholine différent. NACHMANSOHN (1955) a observé, d'autre part, que l'acétylcholinestérase de l'organe électrique du Gymnote hydrolyse aussi rapidement la propionylcholine que l'acétylcholine.

On constate, en second lieu, des *différences importantes entre les muscles d'une même espèce animale.*

Chez le Poisson-chat, l'activité cholinestérasique est plus importante dans le muscle latéral superficiel que dans le muscle latéral profond ; chez les Mammifères, l'activité, tant acétylcholinestérasique que butyrylcholinestérasique, est plus intense dans les « muscles rouges » (diaphragme, soléaire) que dans les « muscles blancs » (tibial antérieur, jumeaux).

Il est intéressant de remarquer que pour ces muscles, la richesse relative en cholinestérases va de pair avec :

— *l'abondance du sarcoplasme*, où sont localisés les enzymes d'oxydation : cytochrome C et vitamine du groupe B (BRAEKKAN, 1956), cytochrome oxydase (UNEMURA, 1951) ;

— *l'importance de la vascularisation et la teneur en myoglobine* (HAMOIR, 1953).

Il apparaît ainsi que la richesse en cholinestérase évolue comme l'importance du métabolisme.

Enfin, il semble exister, chez les Mammifères, une correspondance entre *l'équipement cholinestérasique d'un muscle et celui de son motoneurone.* Chez le Chat, les enzymes du soléaire, muscle extenseur rouge, se différencient par leur activité absolue et relative de ceux du tibial antérieur, muscle fléchisseur blanc, comme les enzymes des motoneurones innervant chez le Rat des muscles extenseurs toniques et des muscles fléchisseurs phasiques.

2° RÉPARTITION DES CHOLINESTÉRASES

Les cholinestérases sont localisées à deux niveaux bien distincts des fibres musculaires : à la jonction neuro-musculaire et à la jonction musculo-tendineuse, et distribuées, de façon diffuse, dans les régions aneurales des fibres. Cette répartition varie cependant pour les diverses espèces animales étudiées :

— Dans le muscle latéral superficiel du Poisson-chat, l'acétylcholinestérase, seul enzyme mis en évidence, présente une activité locale très voisine aux jonctions neuro-musculaires et musculo-tendineuses; l'activité diffuse paraît y être importante, ce qui a été directement confirmé chez les Poissons électriques où les conditions expérimentales étaient favorables.

— Dans le muscle droit abdominal (ou rectus) de la Grenouille, l'activité cholinestérasique des deux localisations principales des fibres rapides et lentes est due à une acétylcholinestérase et à une butyrylcholinestérase. L'activité acétylcholinestérasique locale est environ trois fois plus intense au niveau des jonctions neuro-musculaires qu'au niveau des insertions des fibres rapides. L'activité butyrylcholinestérasique, très semblable dans l'une et l'autre localisation, présente de ce fait, au niveau des insertions tendineuses, une activité relative plus importante, pouvant être estimée approximativement à 50 % de l'activité acétylcholinestérasique.

Les fibres lentes se distinguent des fibres rapides par une activité cholinestérasique plus intense au niveau des insertions tendineuses qu'au niveau des synapses neuro-musculaires.

L'activité cholinestérasique « diffuse » est moins importante dans les muscles de la Grenouille que dans ceux du Poisson-chat.

— Chez les Mammifères, l'activité cholinestérasique synaptique est attribuable à une acétylcholinestérase et à une butyrylcholinestérase. L'activité relative de la butyrylcholinestérase est à ce niveau nettement plus faible que son activité relative moyenne dosée sur les muscles entiers. Cet écart ainsi que les colorations diffuses obtenues sur certaines préparations musculaires indiquent que dans cette classe de Vertébrés, l'activité cholinestérasique diffuse est importante et qu'elle est surtout attribuable à une butyrylcholinestérase. Elle varie toutefois suivant les muscles; elle est plus importante dans les muscles où l'activité cholinestérasique totale est plus importante, c'est-à-dire dans les muscles rouges (diaphragme, soléaire) que dans les muscles blancs (tibial, antérieur, jumeaux).

Ainsi, l'acétylcholinestérase chez les Poissons, l'acétylcholinestérase et la butyrylcholinestérase chez la Grenouille et les Mammifères présentent des localisations similaires aussi bien dans les régions d'innervation motrice que dans les régions aneurales. La butyrylcholinestérase est cependant, de façon relative, surtout localisée dans les régions aneurales.

3° RÔLE DES CHOLINESTÉRASES

Les techniques que nous avons utilisées permettent seulement de tirer des conclusions sur l'intervention des cholinestérases dans les conditions pharmacologiques. Ces conclusions ne peuvent être extrapolées au rôle de ces enzymes dans les conditions normales du muscle; les conditions physiologiques sont trop différentes. Les renseignements biochimiques, histo-chimiques et pharmacologiques que nous avons rassemblés permettent cependant d'émettre des hypothèses sur ce rôle et d'indiquer les voies expérimentales qui pourraient les vérifier.

a) *Intervention des cholinestérases dans les conditions pharmacologiques.* — Dans les conditions de l'organe isolé, les deux portions du muscle latéral du Poisson-chat, comme le rectus de Grenouille, sont sensibles à l'action dépolarisante des esters acétique, propionique et butyrique de la choline. Leur sensibilité vis-à-vis de ces esters est accrue lorsqu'ils ont été traités auparavant par des anticholinestérasiques, mais suivant des modalités différentes qui dépendent du muscle, de l'ester et de la nature de l'anticholinestérasique.

L'étude des potentialisations des esters de la choline montre :

— que leur valeur maximale est toujours nettement plus importante que celle éventuellement obtenue avec des substances actives non hydrolysables, telles que l'amytriméthylammonium et la choline;

— qu'elles apparaissent pour des concentrations d'anticholinestérasiques qui inhibent sélectivement *in vitro* l'hydrolyse de ces esters; dans le cas particulièrement étudié du rectus de Grenouille, des potentialisations liminaires aussi bien de l'acétylcholine que de la butyrylcholine sont observées pour les inhibitions liminaires de leur enzyme respectif.

Le mécanisme de sensibilisation du rectus de Grenouille et du muscle latéral du Poisson-chat aux esters de la choline est donc essentiellement, si ce n'est exclusivement, de nature enzymatique.

Il ressort en outre de cette étude que la spécificité des enzymes pour les anticholinestérasiques, établie *in vitro*, pour de fortes doses d'esters, se retrouve, *in vivo*, pour des doses pharmacologiquement actives de ces esters, ce que les techniques cinétiques biochimiques actuelles ne permettaient de prévoir qu'avec des extrapolations très hasardeuses.

b) *Rôle physiologique.* — Si le rôle de l'acétylcholinestérase synaptique s'explique dans le cadre de la théorie neuro-humorale, sa présence à d'autres niveaux — en particulier à la jonction musculo-tendineuse — reste encore inexplicée. Elle pose, entre autres, le problème de l'existence des récepteurs en dehors des régions synaptiques. Ce problème ne peut cependant être abordé qu'au moyen de techniques très différentes de celles qui nous avons utilisées, techniques qui seraient applicables à

l'échelle de la fibre musculaire. Par exemple, la combinaison de méthodes ionophorétiques et électrophysiologiques a permis à MILEDI (1959, 1960) de déceler des récepteurs à l'acétylcholine en dehors de la plaque motrice. En utilisant dans ces techniques des anticholinestérases de spécificité différente, elles seraient susceptibles d'apporter aussi des précisions sur le rôle des cholinestérases non synaptiques.

Il convient, en outre, de ne pas perdre de vue un rôle éventuel des acétylcholinestérases aneurales dans le métabolisme de la choline. On sait en effet que cette substance entre dans la composition de nombreux composés biologiques, tels les phospholipides. Cette hypothèse ne repose cependant sur aucun support expérimental.

Le rôle de la butyrylcholinestérase n'a pu trouver, jusqu'à maintenant, aucune explication. Il pourrait être surtout extra-synaptique, puisque la localisation principale de cet enzyme, particulièrement dans les muscles « rouges lents » des Mammifères, est aneurale. Son rôle synaptique est beaucoup moins important que celui de l'acétylcholinestérase :

— la butyrylcholinestérase n'est présente, en effet, que dans les muscles de certaines espèces (Grenouille, Mammifères), et son éventuelle fonction peut être assumée par un autre enzyme (Poissons);

— son activité synaptique est en général faible, en particulier chez les Mammifères.

Pour secondaire qu'il soit, ce rôle ne doit cependant pas être négligé, pour le rectus de Grenouille en particulier, où l'activité butyrylcholinestératique représente 25 % de l'activité acétylcholinestératique aux synapses. Une intervention palliative dans l'hydrolyse de l'acétylcholine doit être exclue *a priori*, puisque nous avons observé que, *in vitro* et aussi *in vivo*, où les quantités actives d'acétylcholine sont faibles, la butyrylcholinestérase n'hydrolyse pas cet ester. Si cet enzyme synaptique joue un rôle, ce doit être dans l'hydrolyse d'autres esters. On remarquera que la propionylcholine et la butyrylcholine apparaissent aussi bien adaptées aux « récepteurs » du rectus de Grenouille que l'acétylcholine. En effet, dans les meilleures conditions — réalisées lorsque les cholinestérases du muscle sont inactivées —, elles sont aussi actives que l'acétylcholine.

Un rôle physiologique de ces esters implique cependant qu'ils soient présents dans le muscle. Jusqu'à présent, l'acétylcholine est le seul ester qui ait été mis en évidence. Divers auteurs ont montré toutefois que la propionylcholine et la butyrylcholine sont également des substances biologiques : le premier a été extrait de la rate de Mouton (BANISTER, WHITTAKER et WIJESUNDERA, 1951 et 1953; GARDINER et WHITTAKER, 1954); le second, du cerveau de Bœuf (HOLTZ et SCHUMANN, 1959). La présence d'autres esters que l'acétylcholine dans le muscle n'est donc pas improbable. Nous sommes d'autant plus tentée de le croire que, dans quelques expériences chromatographiques préliminaires, nous avons obtenu, à

partir d'extraits musculaires de Rat, dans un solvant n-butanol-éthanol-acide acétique-eau, une substance au Rf de la propionylcholine, colorable par la dipicrylamine. Une telle caractérisation est insuffisante pour qu'on puisse affirmer qu'il existe de la propionylcholine dans le muscle. Il conviendrait en effet de confirmer sa présence avec des méthodes plus spécifiques, en particulier avec des méthodes biologiques.

De même que dans le cas du système sympathique, il a été établi qu'en plus de l'adrénaline, d'autres amines catéchiques interviennent; il est à présent possible d'entrevoir, de façon hypothétique toutefois, une pluralité de transmetteurs dans le système cholinergique.

RÉSUMÉ

La nature, la distribution et le rôle pharmacologique des cholinestérases musculaires sont étudiés chez des animaux appartenant à diverses classes de Vertébrés au moyen de trois techniques différentes : la technique biochimique de Warburg-Ammon, la technique histochimique de Koelle et Friedenwald et la technique pharmacologique de l'organe isolé.

1° La nature des cholinestérases varie suivant l'origine des animaux. Dans le muscle droit abdominal de la Grenouille et les muscles de Mammifères, l'activité cholinestérasique est attribuée à une acétylcholinestérase et à une butyrylcholinestérase. Dans le muscle latéral superficiel du Poisson-chat et les organes électriques du Malaptérure et du Gnathonemus où elle est très importante, elle est due, pratiquement en totalité, à une acétylcholinestérase.

2° Les deux types de cholinestérases sont présents aux jonctions neuro-musculaires et musculo-tendineuses des fibres « rapides » et « lentes » du muscle droit abdominal de la Grenouille. Leurs activités relatives y sont cependant légèrement différentes; celle de la butyrylcholinestérase est en particulier plus importante aux insertions tendineuses.

Dans les diaphragmes du Cobaye et du Rat, l'activité cholinestérasique synaptique est, de façon prédominante, de nature acétylcholinestérasique. L'activité butyrylcholinestérasique est localisée essentiellement dans les régions aneu-
rales non tendineuses.

Dans le muscle latéral superficiel du Poisson-chat, les activités cholinestérasiques locales sont très semblables aux jonctions neuro-musculaires et musculo-tendineuses. Il paraît également exister une importante activité aneurale diffuse; ce qui est directement montré dans les organes électriques du Malaptérure et du Gnathonemus dont l'origine musculaire est connue.

3° La sensibilisation par les anticholinestérasiques du muscle droit abdominal de la Grenouille et du muscle latéral superficiel du Poisson-chat aux esters acétique, propionique et butyrique de la choline est essentiellement de nature enzymatique. Dans les conditions pharmacologiques, l'hydrolyse enzymatique de doses actives de substrats présente la même spécificité que celle observée *in vitro* avec de fortes concentrations.

Les renseignements biochimiques, histochimiques et pharmacologiques obtenus pour les différents muscles permettent d'émettre des hypothèses sur le rôle physiologique de l'acétylcholinestérase et de la butyrylcholinestérase.

BIBLIOGRAPHIE

- ADAMS (D. H.), 1949. — The specificity of the human erythrocyte cholinesterase. *Biochim. biophys. Acta*, **3**, 1-14.
- ADAMS (D. H.) et THOMPSON (R. H. S.), 1948. — Selective inhibition of cholinesterases. *Biochem. J.*, **42**, 170-175.
- ADAMS (D. H.) et WHITTAKER (V. P.), 1949. — The cholinesterases of human blood. I. The specificity of the plasma enzyme and its relation to the erythrocyte cholinesterase. *Biochim. biophys. Acta*, **3**, 358-366.
- AESCHLIMANN (J. A.) et REINERT (M.), 1931. — The pharmacological action of some analogues of physostigmine. *J. Pharmacol. exp. Ther.*, **43**, 413-444.
- ALLES (G. A.) et HAWES (R. C.), 1940. — Cholinesterases in the blood of Man. *J. biol. Chem.*, **133**, 375-390.
- AMMON (R.), 1933. — Die fermentative Spaltung des Acetylcholins. *Pflüg. Arch.*, **233**, 486-491.
- AUGUSTINSSON (K. B.), 1948. — Cholinesterases. A study in comparative enzymology. *Acta physiol. scand.*, **15** (suppl. 52), 1-181.
- 1955. — The electric organs and their cholinesterase activity. *Pubbl. Staz. zool. Napoli*, **27**, 189-198.
- AUGUSTINSSON (K. B.) et ISACHSEN (T.), 1957. — The enzymatic hydrolysis of the β -methyl derivatives of acetylcholine and acetylthiocholine. *Acta chem. scand.*, **11**, 750-751.
- AUGUSTINSSON (K. B.) et JOHNELS (A. G.), 1958. — The acetylcholine system of the electric organ of *Malapterurus electricus*. *J. Physiol.*, **140**, 498-500.
- AUSTIN (L.) et BERRY (W. K.), 1953. — Two selective inhibitors of cholinesterase. *Biochem. J.*, **53**, 9 P.
- BABUCHIN (A.), 1876. — Uebersicht der nerven Untersuchungen über Entwicklung Bau und physiologische Verhältnisse der elektrischen und pseudo elektrischen Organe. *Arch. f. Anat. Physiol.*, **18**, 501-542.
- BACQ (Z. M.), 1947. — Action du D. F. P. (di-isopropylfluorophosphonate) sur le rectus isolé d'Amphibien et l'intestin isolé de Mammifère. *C. R. Soc. Biol.*, **141**, 857-859.
- BANISTER (J.), WHITTAKER (V. P.) et VIJESUNDERA (S.), 1953. — The occurrence of homologues of acetylcholine in ox spleen. *J. Physiol.*, **121**, 55-71.
- BARETS (A.), 1952. — Différences dans le mode d'innervation des diverses portions du muscle latéral et leurs rapports avec la structure musculaire chez le Poisson-Chat (*Ameiurus nebulosus* les.). *Arch. Anat. micr. et Morphol. expér.*, **41**, 305-331.
- 1955. — Caractéristiques morphologiques des deux types d'innervation motrice du muscle latéral des Téléostéens. *C. R. Soc. Biol.*, **149**, 1420-1422.
- 1961. — Contribution à l'étude des systèmes moteurs « lents » et « rapides » du muscle latéral des Téléostéens. *Arch. Anat. micr. et Morphol. expér.*, **50**, 92-187.
- BARETS (A.), FESSARD (A.) et LE TOUZE (S.), 1956. — Etude électrophysiologique d'un type particulier de jonction neuromusculaire : le système moteur rapide des Téléostéens. *J. Physiol.*, Paris, **48**, 381-383.
- BARETS (A.) et LE TOUZE (S.), 1956. — Identification dans le muscle latéral d'un Téléostéen (*Tinea tinca* L.) de deux systèmes moteurs « lent » et « rapide ». *C. R. Ac. Sci.*, **242**, 1230-1233.
- BARETS (A.) et PECOT-DECHAVASSINE (M.), 1959. — Caractéristiques pharmacologiques des fibres musculaires striées « lentes » et « rapides » du muscle latéral du Poisson-chat (*Ameiurus nebulosus*). *C. R. Ac. Sci.*, **249**, 789-791.
- BARNES (J. M.) et DUFF (J. I.), 1953. — The role of cholinesterase at the myoneural junction. *Brit. J. Pharmacol.*, **8**, 334-339.
- BLASCHKO (H.) et HOLTON (P.), 1949. — The enzymic hydrolysis of triacetin (glyceryl triacetate). *Brit. J. Pharmacol.*, **4**, 181-184.
- BOURGUIGNON (G.), 1947. — Triple contraction et triple chronaxie du muscle strié. Différences histologiques et chimiques entre les faisceaux de chronaxie différente. *Rev. Neurol.*, **79**, 567-590.

- BOURGUIGNON (G.) et HUMBERT (R.), 1947. — Triple contraction et triple chronaxie du muscle strié normal de l'Homme et des Mammifères. *C. R. Soc. Biol.*, **141**, 549-551.
- BOVET-NITTI (F.) et BOVET (D.), 1953. — Bis-(2-diéthylaminoéthyl)-benzoldicarbonsäureester-dialkyljodide als spezifische Hemmstoffe der True-Cholinesterase und der Pseudo-Cholinesterase. *Arch. exp. Path. Pharmacol.*, **220**, 52-61.
- BOWMAN (W. C.) et ZAIMIS (E.), 1958. — The effects of adrenaline, noradrenaline and isoprenaline on skeletal muscle contractions in the Cat. *J. Physiol.*, **144**, 92-107.
- BRAEKKAN (O. R.), 1956. — Function of the red muscle in Fish. *Nature (Lond.)*, **178**, 747-748.
- BREMER (F.) et DESMEDT (J. E.), 1947. — Nouvelles recherches sur la contraction pseudo-tétanique du muscle squelettique. *Arch. int. Physiol.*, **55**, 290-292.
- BROOKS (V. B.) et MYERS (D. K.), 1952. — Cholinesterase content of normal and denervated skeletal muscle in the Guinea-pig. *J. Physiol.*, **116**, 158-167.
- BROWN (G. L.), DALE (H. H.) et FELDBERG (W.), 1936. — Reactions of the normal mammalian muscle to acetylcholine and to eserine. *J. Physiol.*, **87**, 394-424.
- BULLER (A. J.), ECCLES (J. C.) et ECCLES (R. M.), 1960. — Interactions between motoneurons and muscles in respect of the characteristic speeds of their responses. *J. Physiol.*, **150**, 417-439.
- BURGEN (A. S. V.), 1949. — The mechanism of action of anticholinesterase drugs. *Brit. J. Pharmacol.*, **4**, 219-228.
- BURN (B. D.) et PATON (W. D. M.), 1951. — Depolarization of the motor endplate by decamethonium and acetylcholine. *J. Physiol.*, **115**, 41-73.
- CHANG (H. C.) et GADDUM (J. H.), 1933. — Choline esters in tissue extracts. *J. Physiol.*, **79**, 255-285.
- COHEN (J. A.) et POSTHUMUS (C. H.), 1955. — The mechanism of action of anticholinesterases. *Acta physiol. pharmacol. neerl.*, **4**, 17-36.
- 1957. — The mechanism of action of anticholinesterases. III. The action of anticholinesterases on the phrenic nerve-diaphragm preparation of the Rat. *Acta physiol. pharmacol. neerl.*, **5**, 385-397.
- COHEN (J. A.), WARRINGA (M. G. P. J.) et BOVENS (B. K.), 1951. — Protection of the cholinesterase against di-isopropylfluorophosphonate by butyrylcholine. *Biochim. et biophys. Acta*, **6**, 469-476.
- COHEN (J. A.), WARRINGA (M. G. P. J.) et INDORF (I.), 1955. — Relationship between the pharmacological action of neuromuscular drugs and their capacity to inhibit esterases. *Acta physiol. pharmacol. neerl.*, **4**, 187-200.
- COPP (F. C.), 1953. — Diacid bases. Part. I. Compounds related to 1,5-diphenylpentane-pp'-bis (trialkylammonium) salts as anticholinesterases. *J. chem. Soc.*, **3**, 3116-3118.
- COUCEIRO (A.), ALMEIDA (D. F. DE) et FREIRE (J. R. C.), 1953. — Localisation histochemique de l'acétylcholinestérase dans le tissu électrique de l'*electrophorus electricus* (L.). *An. Acad. bras. de Cienc.*, **25**, 208-214.
- COUTEAUX (R.), 1942. — La cholinestérase des plaques motrices après section du nerf moteur. *Bull. Biol. Fr. et Belg.*, **76**, 14-57.
- 1944. — Nouvelles observations sur la structure de la plaque motrice et interprétation des rapports myoneuraux. *C. R. Soc. Biol.*, **138**, 976-978.
- 1947. — Contribution à l'étude de la synapse myoneurale (Buisson de Kühne et plaque motrice). *Rev. canad. Biol.*, **6**, 563-711.
- 1951. — Remarques sur les méthodes actuelles de détection histochemique des activités cholinestérasiques. *Arch. int. Physiol.*, **59**, 526-537.
- 1952. — Le système moteur à « petites » fibres nerveuses et à contraction « lente » : contribution à son identification histologique sur les muscles de la Grenouille. *C. R. Ass. Anat.* 39^e réunion Clermont-Ferrand, 264-269.
- 1953. — Particularités histochemiques des zones d'insertion du muscle strié. *C. R. Soc. Biol.*, **147**, 1974-1976.
- 1954. — Sur la zone de transition des insertions musculaires. *C. R. Ass. Anat.*, 41^e réunion, Gênes, 1166.
- 1955. — Les jonctions intertissulaires, in J. A. Thomas, Exposés actuels de Biologie cellulaire, Masson et C^{ie}, édit., Paris.

- 1956. — Discrimination histochimique entre les fibres musculaires striées de la Grenouille commandées par des systèmes moteurs différents. *C. R. Acad. Sci.*, **242**, 820-822.
- 1958. — Sur le mode de terminaison des myofibrilles et leurs connexions avec la membrane sarcoplasmique au niveau de la jonction musculo-tendineuse. *C. R. Ac. Sci.*, **246**, 307-309.
- COUTEAUX (R.) et NACHMANSOHN (D.), 1940. — Changes of cholinesterase at endplates of voluntary muscle following section of sciatic nerve. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.-Y.)*, **43**, 177-181.
- COUTEAUX (R.) et SZABO (T.), 1959. — Siège de la jonction nerf-électroplaque dans les organes électriques à électroplaques pédiculés. *C. R. Ac. Sci.*, **248**, 457-460.
- COUTEAUX (R.) et TAXI (J.), 1951. — Recherches histochimiques sur les cholinestérases synaptiques. *C. R. Ass. Anat.*, 38^e réunion, Nancy, **70**, 1030.
- 1952 a. — Distribution de l'activité cholinestérasiqque au niveau de la synapse myoneurale. *C. R. Ac. Sci.*, **235**, 434-437.
- 1952 b. — Recherches histochimiques sur la distribution des activités cholinestérasiqques au niveau de la synapse myoneurale. *Arch. Anat. micr. et Morphol. expérim.*, **41**, 352-392.
- DAHLGREN (U.), 1910. — The origin of the electric tissues in Fishes. *Amer. Naturalist*, **44**, 193-202.
- DALE (H. H.) et FELDBERG (W.), 1934. — Chemical transmission at motor nerve endings in voluntary muscle. *J. Physiol.*, **81**, 39-40 P.
- DAVISON (A. N.), 1953. — Return of cholinesterase activity in the Rat after inhibition by organophosphorus compounds. *Biochem. J.*, **54**, 583-590.
- DENNY-BROWN (D. E.), 1929. — The histological features of striped muscle in relation to its functional activity. *Proc. roy. Soc. B.*, **104**, 371-411.
- DENZ (F. A.), 1953. — On the histochemistry of the myoneural junction. *Brit. J. exp. Pathol.*, **34**, 329-339.
- 1954. — Cholinesterase inhibition at the myoneural junction. *Brit. J. exp. Pathol.*, **35**, 459-471.
- DEPIERRE (F.) et FUNKE (A.), 1954. — Anticholinestérasiqques. II. Dérivés analogues à la prostigmine. Influence de la structure chimique sur l'intensité et la sélectivité de l'action anti-acétylcholinestérasiqque. *C. R. Ac. Sci.*, **239**, 370-372.
- EARL (C. J.) et THOMPSON (R. H. S.), 1952. — The inhibitory action of tri-orthocresyl phosphate on cholinesterases. *Brit. J. Pharmacol.*, **7**, 261-269.
- EASSON (L. H.) et STEEDMAN (E.), 1936. — The absolute activity of cholinesterase. *Proc. roy. Soc. B.*, **121**, 142-164.
- 1937. — The specificity of cholinesterase. *Biochem. J.*, **31**, 1723-1729.
- ECCLES (I. C.), ECCLES (R. M.) et LUNDBERG (A.), 1957. — Deviation of after-hyperpolarization of motoneurons supplying fast and slow muscles. *Nature*, (Lond.), **179**, 866-868.
- ENGELMANN (T. W.), 1894. — Die Blätterschicht der elektrischen Organe von Raja in ihren genetischen Beziehungen zur quergestreiften Muskel-substanz. *Pflüg. Arch.*, **57**, 149-180.
- EWART (J. C.), 1892. — The electric organ of the Skate. Observations on the structure, relations, progressive development and growth of the electric organ of the Skate. *Philos. Transact., Soc. London.*, **183**, 389-420.
- FATT (P.), 1950. — The electromotive action of acetylcholine at the motor end-plate. *J. Physiol.*, **111**, 408-422.
- FENG (T. P.) et TING (Y. C.), 1938. — Studies on the neuromuscular junction. XI. A note on the local concentration of cholinesterase at motor nerve endings. *Chinese J. Physiol.*, **13**, 141-144.
- FERNAND (U. S. V.) et YOUNG (J. Z.), 1951. — The size of the nerve fibres of muscle nerves. *Proc. roy. Soc. B.*, **139**, 38-58.
- FLEISHER (J. H.), CORRIGAN (J. P.) et HOWARD (J. W.), 1960. — Reciprocal potentiating action of depolarizing drugs on the isolated frog rectus abdominis muscle. *Brit. J. Pharmacol.*, **15**, 23-28.
- FRITSCH (G.), 1883. — Bericht über die Fortsetzung der Untersuchungen an elektrischen Fischen. Beiträge zur Embryologie von Torpedo. *Sitz. Akad. Wiss.*, Berlin, 2^e série, 205-209.

- FUNKE (A.), BAGOT (J.) et DEPIERRE (F.), 1954. — Anticholinestérasiques. I. Synthèse des diphenoxycalcans porteurs d'une ou deux fonctions phénoliques libres. *C. R. Ac. Sci.*, **239**, 329-331.
- FUNKE (A.) et DÄNIKEN (K. VON), 1953. — Préparation et propriétés pharmacologiques de quelques aminométhylcoumaranes. *Bull. Soc. Chim.*, 457-461.
- FUNKE (A.), JACOB (J.) et DÄNIKEN (K. VON), 1953. — Propriétés analgésiques et anticholinestérasiques du dichlorhydrate et du di-iodométhylate de la bis-(pipéridinométhyl-coumaranyl-5)cétone. *C. R. Ac. Sci.*, **236**, 149-151.
- GARDINER (J. E.) et WHITTAKER (V. P.), 1954. — The identification of propionylcholine as a constituent of ox spleen. *Biochem. J.*, **58**, 24-29.
- GEREBTZOFF (M. A.), 1954. — Appareil cholinestérasique à l'insertion tendineuse des fibres musculaires striées. *C. R. Soc. Biol.*, **148**, 632-634.
- GIACOBINI (E.), 1959. — Determination of cholinesterase in the cellular components of neurones. *Acta physiol. scand.*, **45**, 311-327.
- GIACOBINI (E.) et HOLMSTEDT (B.), 1958. — Cholinesterase content of certain regions of the spinal cord as judged by histochemical and cartesian diver technique. *Acta physiol. scand.*, **42**, 12-27.
- GLICK (D.), 1939. — Further studies on the specificity of choline esterase. *J. biol. Chem.*, **130**, 527-534.
- 1941. — Effect of sodium and potassium ions on cholinesterase. *Nature (Lond.)*, **148**, 662-663.
- GOLDSTEIN (A.), 1951. — Properties and behavior of purified human plasma cholinesterase. Competitive inhibition by Prostigmine and other alkaloids with special reference to differences in kinetic behavior. *Arch. Biochem. Biophys.*, **34**, 169-188.
- GOLDSTEIN (A.) et HÄMLISCH (R. E.), 1952. — Properties and behavior of purified human plasma cholinesterase. IV. Enzymatic destruction of the inhibitors Prostigmine and Physostigmine. *Arch. Biochem. Biophys.*, **35**, 12-22.
- GOLDSTEIN (A.), KRAYER (O.), ROOT (M. A.), ACHESON (G. H.) et DOHERTY (M. E.), 1949. — Plasma neostigmine levels and cholinesterase inhibition in Dogs and myasthenic patients. *J. Pharm. exp. Ther.*, **96**, 56-85.
- GRANIT (R.), HENATSCH (H. D.) et STEG (G.), 1956. — Tonic and phasic ventral horn cells differentiated by post-tetanic potentiation in Cat extensors. *Acta physiol. scand.*, **37**, 114-126.
- GRAY (E. G.), 1958. — The structures of fast and slow muscle fibres in the Frog. *J. Anat.*, **92**, 559-562.
- GUNTHER (P.), 1949. — Die Innervation des *M. sartorius* und des *M. iliofibularis* des Frosches. *Anat. Anz. Deutsch.*, **97**, 175.
- HÄGGQVIST (G.), 1960. — Cholinesterases and innervation of skeletal muscles. *Acta physiol. scand.*, **48**, 63-70.
- HALL (S. A.) et JACOBSON (M.), 1948. — Hexaethyltetraphosphate and tetraethylpyrophosphate. *Indust. Engng. Chem.*, **40**, 694-699.
- HAMOIR (G.), 1953. — Myoglobin from carp muscle. *Nature (Lond.)*, **171**, 345-346.
- HAWKINS (R. D.) et GUNTER (J. M.), 1946. — The selective inhibition of pseudo-cholinesterase *in vivo*. *Biochem. J.*, **40**, 192-197.
- HAWKINS (R. D.) et MENDEL (B.), 1947. — Selective inhibition of pseudo-cholinesterase by D. F. P. *Brit. J. Pharmacol.*, **2**, 173-180.
- 1949. — Studies on cholinesterase. VI. The selective inhibition of true cholinesterase *in vivo*. *Biochem. J.*, **44**, 260-264.
- HOBBIGER (F.), 1950. — The action of carbamic esters and tetraethylpyrophosphate in normal and curarized Frog rectus muscle. *Brit. J. Pharmacol.*, **5**, 37-48.
- HOLMSTEDT (B.), 1957 a. — A modification of the thiocholine method for the determination of cholinesterase. I. Biochemical evaluation of selective inhibitors. *Acta physiol. scand.*, **40**, 322-330.
- 1957 b. — A modification of the thiocholine method for the determination of cholinesterase. II. Histochemical application. *Acta physiol. scand.*, **40**, 331-337.

- HOLMSTEDT (B.) et SKOGLUND (C. R.), 1953. — The action on spinal reflexes of dimethyl-amido-ethoxy-phosphoryl cyanide (Tabun), a cholinesterase inhibitor. *Acta physiol. scand.*, **29**, suppl. 106, 410-427.
- HOLTON (P.), 1948. — The enzymic hydrolysis of triacetin (glyceryl triacetate). *Biochem. J.*, **43**, Proc. xiii.
- HOLTZ (P.) et SCHUMANN (H. J.), 1954. — Butyrylcholine in Gehirnextrakten. *Naturwissenschaften*, **41**, 306.
- HURSH (J. B.), 1939. — Conduction velocity and diameter of nerve fibers. *Am. J. Physiol.*, **127**, 131-153.
- HUTTER (O. F.), 1952. — Effect of choline on neuromuscular transmission in the Cat. *J. Physiol.*, **117**, 241-250.
- JACOB (J.), 1954 a. — Sur l'inhibition sélective des acétylcholinestérases *in vivo* chez le Chien. *Experientia*, **10**, 1-6.
- 1954 b. — Actions d'un inhibiteur sélectif des acétylcholinestérases, le 3318 CT, sur la transmission neuromusculaire du Chat. *Experientia*, **10**, 496-498.
- 1955. — Propriétés anti-acétylcholinestérasiques spécifiques du di-iodométhylate de la bis-(pipéridino-méthyl-coumaranyl-5) cétone (3318 CT). I. Relation entre la structure chimique et le pouvoir anti-acétylcholinestérasique. Pouvoirs inhibiteurs *in vitro* et *in vivo*. *Arch. int. Pharmacodyn.*, **101**, 446-468.
- 1956. — Propriétés anti-acétylcholinestérasiques spécifiques du di-iodométhylate de la bis-(pipéridinométhyl-coumaranyl-5) cétone (3318 CT). *Arch. int. Pharmacodyn.*, **106**, 395-436.
- JACOB (J.) et DECHAVASSINE (M.), 1955. — Actions de la néostigmine, du D. F. P. et du 3318 CT sur la sensibilité du rectus de Grenouille aux esters acétique, propionique et butyrique de la choline. *Experientia*, **11**, 235-240.
- 1956. — Inhibition sélective des « vraies » et « pseudo » cholinestérases du rectus de Grenouille. *Experientia*, **12**, 434-439.
- JACOB (J.) et FUNKE (A.), 1953. — Relations entre la structure chimique et les propriétés anticholinestérasiques d'un groupe d'inhibiteurs sélectifs de l'acétylcholinestérase globulaire du Chien. *C. R. Ac. Sci.*, **237**, 1809-1811.
- JACOB (J.) et PECOT-DECHAVASSINE (M.), 1958. — Hydrolyse enzymatique de la propionylcholine, de l'acétylthiocholine et de la butyrylthiocholine par le rectus de Grenouille. *Experientia*, **14**, 330-336.
- JARCHO (L. W.), EYZAGUIRRE (C.), TALBOT (S. A.) et LILIENTHAL (J. T.), 1950. — Neuromuscular excitation: Response of normal and denervated mammalian muscle to bis-trimethylammonium decane (C10) and to d-tubocurarine. *Am. J. Physiol.*, **162**, 475-488.
- JEWELL (P. A.) et ZAIMIS (E. J.), 1953. — Differentiation between red and white muscle using neuromuscular blocking agents. *J. Physiol.*, **120**, 47 P.
- 1954. — A differentiation between red and white muscle in the Cat based on responses to neuromuscular blocking agents. *J. Physiol.*, **124**, 417-428.
- JOHNELS (A. G.), 1956. — On the origin of the electric organ in *Malapterurus electricus*. *Quart. J. Micr. Sc.*, **97**, 455-464.
- KOELLE (G. B.), 1950. — The histochemical differentiation of types of cholinesterases and their localization in tissues of the Cat. *J. Pharm. exp. Ther.*, **100**, 158-179.
- 1955. — The histochemical identification of acetylcholinesterase in cholinergic, adrenergic and sensory neurons. *J. Pharmacol. exp. ther.*, **114**, 167-184.
- KOELLE (G. B.) et FRIEDENWALD (J. S.), 1949. — A histochemical method for localizing cholinesterase activity. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **70**, 617-622.
- KOELLE (G. B.) et GILMAN (A.), 1946. — The relationship between cholinesterase inhibition and the pharmacological action of D. F. P. *J. Pharmacol. exp. Ther.*, **87**, 435-448.
- KÖVER (A.), KOVACS (T.) et KÖNIG (T.), 1957. — Properties of myosin cholinesterase. *Acta Physiol. Ac. Sci. Hung.*, **11**, 253-258.
- KRAATZ (C. P.), 1960. — Cholinesterase inhibition and spontaneous activity of the frog rectus abdominis muscle. *J. Pharmacol. exp. Ther.*, **130**, 194-203.
- KRÜGER (P.), 1929. — Ueber einen möglichen Zusammenhang zwischen Struktur, Funktion und chemischer Beschaffenheit. *Biol. Zentr.*, **49**, 616-622.

- KRÜGER (P.), DUSPIVA (F.) et FURLINGER (F.), 1933. — Tetanus und Tonus des Skelettmuskeln des Frosches, eine histologische, reizphysiologische und chemische Untersuchung. *Pflüg. Arch.*, **231**, 750-786.
- KRÜGER (P.) et FURLINGER (F.), 1931. — Histologische und chemismus des Tetanus und Tonussubstrates. *Ak. Anz. Ak. Wiss. Wien*, **17**, 1-3.
- KUFFLER (S. W.), 1943. — Specific excitability of the endplate region in normal and denervated muscle. *J. Neurophysiol.*, **6**, 99-110.
- 1953. — The two skeletal nerve-muscle system in Frog. *Arch. exp. Pathol. Pharmacol.*, **220**, 116-135.
- KUFFLER (S. W.), HUNT (C. C.) et QUILLIAM (J. P.), 1951. — Function of medullated small-nerves fibres in mammalian neutral roots: efferent muscle spindle innervation. *J. Neurophysiol.*, **14**, 29-54.
- KUFFLER (S. W.) et VAUGHAN WILLIAMS (E. M.), 1953 a. — Small-nerve junctional potentials. The distribution of small motor nerves to frog skeletal muscle, and the membrane characteristics of the fibres they innervate. *J. Physiol.*, **121**, 289-317.
- 1953 b. — Properties of the « slow » skeletal muscle fibres of the Frog. *J. Physiol.*, **121**, 318-340.
- KUHNE (W.), 1865. — Ueber den Farstoff der Muskeln. *Arch. Pathol. Anat. Physiol. Klin. Med.*, **33**, 79-94.
- LANGEMANN (K.), 1944. — Ueber das Vorkommen verschiedener cholinesterase-Typen in menschlichen Organen. *Helv. physiol. pharm. Acta*, **2**, C17.
- LEVINE (M. G.) et SURAN (A. A.), 1950. — A new cholinesterase in Swine serum. *Nature (Lond.)*, **166**, 698.
- LINDEMAN (V. F.), 1945. — A comparative study of the cholinesterase activity of the vertebrate nervous system with special reference to its relationship to motor ability. *Am. J. Physiol.*, **143**, 687-691.
- LOEWI (O.), 1921. — Ueber humorale übertragbarkeit der Herznerven wirkung. *Pflüg. Arch.*, **189**, 239-242.
- 1924. — Ueber humorale Übertragbarkeit der Herznerven wirkung. *Pflüg. Arch.*, **204**, 361-367.
- LOEWI (O.) et NAVRATIL (E.), 1926. — Ueber humorale Übertragbarkeit der Herz nerven wirkung. Ueber das Schicksal des Vagusstoffs. *Pflüg. Arch.*, **214**, 678-688.
- LUNDIN (S. J.), 1959. — Acetylcholinesterase in goldfish muscles. Studies on some substrates and inhibitors. *Biochem. J.*, **72**, 210-214.
- MAANEN (E. F.), 1950. — The antagonism between acetylcholine and the curare alkaloids, d-tubocurarine, c-curarine-I, c-toxiferine-II and β -erythroidine in the rectus abdominis of the Frog. *J. Pharmacol. exp. Ther.*, **99**, 255-264.
- MCCOMBIE (H.) et SAUNDERS (B. C.), 1946. — Alkylfluorophosphonates: Preparation and physiological properties. *Nature (Lond.)*, **157**, 287-289.
- MALMGREN (H.) et SYLVEN (B.), 1955. — On the chemistry of the thiocholin method of Koelle. *J. Histochem. Cytochem.*, **3**, 441-445.
- MARNAY (A.), 1938 a. — Cholinesterase dans le muscle strié de la Tortue. *C. R. Soc. Biol.*, **127**, 896-898.
- 1938 b. — Cholinestérase dans le muscle strié du Crapaud. *C. R. Soc. Biol.*, **128**, 290-291.
- MARNAY (A.) et NACHMANSOHN (D.), 1937 a. — Cholinestérase dans le muscle strié. *C. R. Soc. Biol.*, **124**, 942-944.
- 1937 b. — Sur la répartition de la cholinestérase dans le muscle couturier de la Grenouille. *C. R. Soc. Biol.*, **125**, 41-43.
- 1937 c. — Cholinestérase dans le muscle du Lézard. *C. R. Soc. Biol.*, **125**, 489-490.
- 1937 d. — Action de l'acétylcholine sur le muscle isolé. *C. R. Soc. Biol.*, **125**, 1007-1009.
- 1937 e. — Cholinestérase dans le muscle strié après dégénérescence du nerf moteur. *C. R. Soc. Biol.*, **126**, 785-787.
- 1937 f. — Cholinesterase in voluntary Frog's muscle. *J. Physiol.*, **89**, 359-367.
- 1938. — Choline esterase in voluntary muscle. *J. Physiol.*, **92**, 37-47.

- MAURER (F.), 1913. — Die ventrale Rumpfmuskulatur der Fische (Selachier, Ganoiden, Teleostier, Grossopterygier, Dipnoer). *Jen. Zschr.*, **49**, 1-118.
- MAZUR (A.) et BODANSKY (O.), 1946. — Mechanism of *in vitro* and *in vivo* inhibition of cholinesterase activity of DFP. *J. biol. Chem.*, **163**, 261-276.
- MEER (C. VAN DER) et MEETER (E.), 1956 a. — The mechanism of action of anticholinesterases. II. The effect of di-isopropylfluorophosphonate (DFP) on the isolated Rat phrenic-nerve diaphragm preparation. Irreversible effects. *Acta physiol. pharmacol. neerl.*, **4**, 454-471.
- 1956 b. — The mechanism of action of anticholinesterases. II. The effect of di-isopropylfluorophosphonate (DFP) on the isolated Rat phrenic-nerve diaphragm preparation. Reversible effects. *Acta physiol. pharmacol. neerl.*, **4**, 472-481.
- MENDEL (B.), MUNDELL (D. B.) et RUDNEY (H.), 1943. — Studies on cholinesterase specific tests for true cholinesterase and pseudocholinesterase. *Biochem. J.*, **37**, 473-476.
- MENDEL (B.) et RUDNEY (H.), 1943. — Studies on cholinesterase. Cholinesterase and pseudocholinesterase. *Biochem. J.*, **37**, 59-63.
- 1944. — The cholinesterases in the light of recent findings. *Science*, **100**, 499-500.
- MILEDI (R.), 1959. — The acetylcholine sensitivity of frog muscle fibres after complete or partial denervation. *J. Physiol.*, **147**, 45-46 P.
- 1960. — Junctional and extra-junctional acetylcholine receptors in skeletal muscle fibres. *J. Physiol.*, **151**, 24-30.
- MIQUEL (O.), 1946. — The action of physostigmine, di-isopropylfluorophosphate and other parasympathomimetic drugs on the rectus muscle of the Frog. *J. Pharmacol. exp. Ther.*, **88**, 67-71.
- MOUNTER (L. A.) et WHITTAKER (V. P.), 1950. — The esterases of horse blood. 2. The specificity of horse erythrocyte cholinesterase. *Biochem. J.*, 1950, **47**, 525-530.
- MYERS (D. K.), 1952. — Determination of the molar concentration of pseudocholinesterase in serum. *Biochem. J.*, **51**, 303-311.
- 1953. — Species variation in the specificity pattern of the pseudocholinesterases. *Biochem. J.*, **55**, 67-79.
- NACHMANSOHN (D.), 1939 a. — Cholinestérase dans le système nerveux central. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **21**, 761-796.
- 1939 b. — Sur l'inhibition de la cholinestérase. *C. R. Soc. Biol.*, **130**, 1065-1068.
- 1939 c. — Choline esterase in voluntary muscle. *J. Physiol.*, **95**, 29-35.
- 1955. — Die Rolle des Acetylcholins in den Elementarvorgängen der Nervenleitung. *Ergebn. Physiol.*, **48**, 575-683.
- NACHMANSOHN (D.) et ROTHENBERG (M. A.), 1945. — Studies on cholinesterase. I. On the specificity of the enzyme in nerve tissue. *J. biol. Chem.*, **158**, 653-666.
- NACHMANSOHN (D.), ROTHENBERG (M. A.) et FELD (E. A.), 1948. — Studies on cholinesterase. V. Kinetics of the enzyme inhibition. *J. biol. Chem.*, **174**, 247-256.
- OCKS (S.) et MUKHERJEE (A. K.), 1959. — Action of acetylcholine, choline and d-tubocurarine on the membrane of Frog sartorius muscle fibres. *Am. J. Physiol.*, **196**, 1191-1196.
- OGNEFF (J.), 1897. — Ueber die Entwicklung des elektrischen Organs bei Torpedo. *Arch. Anat. Physiol.-Physiol. Abt.*, 270-304.
- ORD (M. G.) et THOMPSON (R. H. S.), 1950. — The distribution of cholinesterase types in mammalian tissues. *Biochem. J.*, **46**, 346-352.
- 1951. — The preparation of soluble cholinesterase from mammalian heart and brain. *Biochem. J.*, **49**, 191-199.
- PATON (W. D. M.) et ZAIMIS (E. J.), 1949. — The action of curarizing substances on respiration in the Cat. *J. Physiol.*, **108**, 34 P.
- 1951. — The action of d-tubocurarine and of decamethonium on respiratory and other muscles in the Cat. *J. Physiol.*, **112**, 311-331.
- PAULESU (F.), VARGIV et GIBERTONI (G.), 1955. — Sull'a differenziazione dell'attività cholinesterasica di materialibologici di origine diversa. *Arch. Int. Pharmacodyn.*, **104**, 11-18.

- PECOT-DECHAVASSINE (M.), 1958. — Différenciation histochimique des cholinestérases au niveau des jonctions neuromusculaires et musculo-tendineuses du muscle droit abdominal de la Grenouille. *C. R. Ac. Sci.*, **247**, 2489-2491.
- PLATTNER (F.) et HINTNER (H.), 1930. — Die Spaltung von acetylcholin durch Organestrakte und Körperflüssigkeiten. *Pflüg. Arch.*, **225**, 19-25.
- PRENANT (A.), 1912. — Problèmes cytologiques généraux soulevés par l'étude des cellules musculaires. II. Distinction histophysiological des muscles riches et pauvres en sarcoplasme. *J. Anat. Physiol.*, **48**, 259-286.
- RANVIER (L.), 1873. — Propriétés et structures différentes des muscles rouges et des muscles blancs chez les Lapins et chez les Raies. *C. R. Ac. Sci.*, **77**, 1030-1034.
- RICHTER (D.) et CROFT (P. G.), 1942. — Blood esterases. *Biochem. J.*, **36**, 746-757.
- ROTHENBERG (M.) et NACHMANSOHN (D.), 1947. — Studies on cholinesterase. III. Purification of the enzyme from electric tissue by fractional ammonium sulfate precipitation. *J. biol. Chem.*, **168**, 223-231.
- RUSHTON (W. A. H.), 1951. — A theory of the effects of fibre size in medullated nerve. *J. Physiol.*, **115**, 101-122.
- SACHS (H.), STRECKER (H. J.) et WAELSCH (H.), 1954. — Role of thioesters of amino acids in the synthesis of the amine bond. *Science*, **120**, 791.
- SAWYER (C. H.), 1943. — Cholinesterase and the behavior problem in Amblystoma. I. The relationship between the development of the enzyme and early motility. II. The effects of inhibiting cholinesterase. *J. exp. Zool.*, **92**, 1-29.
- SCHÄR-WÜTHRICH (B.), 1943. — Die Wirkungen einiger kreislaufaktiver Substanzen auf Fermente. *Helv. chim. Acta*, **26**, 1836-1855.
- SCHWARZACHER (H. G.), 1960. — Untersuchungen ueber den cholinesterase gehalt der skelettmuskel-sehnenverbindung. *Arch. int. Pharmacodyn.*, **128**, 330.
- SIOU (G.), 1955. — Sur l'activité cholinestérasiqne de la zone « aneurale » des myomères de l'Anguille. *C. R. Soc. Biol.*, **149**, 1422-1425.
- SMITH (M.), COHEN (H. L.), PELIKAN (E. W.) et UNNA (K. R.), 1952. — Mode of action of antagonists to curare. *J. Pharmacol. exp. Ther.*, **105**, 391-399.
- SOMMERKAMP (H.), 1928. — Das Substrat der Dauerverkürzung am Frosch-muskel. *Arch. Exp. Pathol. u. Pharmacol.*, **128**, 99-115.
- STEDMAN (E.), 1926. — Studies on the relationship between chemical constitution and physiological action. I. Position isomerism in relation to the miotic activity of some synthetic urethanes. *Biochem. J.*, **20**, 719-734.
- STURGE (L. M.) et WHITTAKER (V. P.), 1950. — The esterases of horse blood. I. The specificity of horse plasma cholinesterase and aliesterase. *Biochem. J.*, **47**, 518-525.
- SZABO (T.), 1957. — Anatomo-physiologie comparée de divers organes électriques et de leurs centres nerveux de commande. Thèse, Paris.
- TAXI (J.), 1952. — Action du formol sur l'activité de diverses préparations de cholinestérases. *J. Physiol. (Paris)*, **44**, 595-599.
- THESLEFF (S.), 1955 a. — The mode of neuromuscular block caused by acetylcholine, nicotine, decamethonium and succinylcholine. *Acta physiol. scand.*, **34**, 218-231.
- 1955 b. — The effects of acetylcholine, decamethonium and succinylcholine on neuromuscular transmission in the Rat. *Acta physiol. scand.*, **34**, 386-392.
- THOMPSON (R. H. S.), 1947. — The action of chemical vesicants on cholinesterase. *J. Physiol.*, **105**, 370-381.
- UMENURA (K.), 1951. — Respiratory enzymes of Tiaï (Fish red muscle). *Nagaja J. med. Sci.*, **14**, 81-85.
- WACHHOLDER (K.), 1931. — Untersuchungen über « tonische » und « nicht tonische » Wirbeltiermuskeln. III. Verchiedenes Verhalten bei ermüdender Reizung. *Pflüg. Arch.*, **226**, 274-291.
- WACHHOLDER (K.) et LEDEBUR (J. F. von), 1930. — Untersuchungen über « tonische » und « nicht tonische » Wirbeltiermuskeln. I. Die Umklammerungshaltung des Frosches und die Schutzhaltung der Schildkröte; ihre spezifische Nachahmung durch muskuläre Acetylcholin-wirkung. *Pflüg. Arch.*, **225**, 627-642.

- WACHHOLDER (K.) et NOTHMANN (F.), 1932. — Jahreszeitliches Schwanken zwischen « tonischem » und « nicht tonischem » Verhalten von Wirbeltiermuskeln. *Pflüg. Arch.*, **229**, 120-132.
- WHITE (E. G.), 1918. — The origin of the electric organs in *Astrocopus guttatus*. *Carnegie Institute of Washington*, **12**, 139-172.
- YOUNG (J. Z.), 1933. — The preparation of isotonic solutions for use in experiments with Fish. *Pubbl. St. Zool. Napoli*, **12**, 425-431.
- ZAIMIS (E. J.), 1951. — The action of decamethonium on normal and denervated mammalian muscle. *J. Physiol.*, **112**, 176-190.
- ZELLER (E. A.), 1942. — Hemmung der cholin-esterase durch pyrazolone, zugleich ein Beitrag zur differenzierung der Cholin-esterasen verschiedener Herkunft. *Helv. Chim. Acta*, **25**, 1099-1110.
- ZELLER (E. A.) et BISSEGER (A.), 1943. — Ueber die cholinesterase des Gehirns und der Erythrocyten. *Helv. chim. Acta*, **26**, 1619-1630.
-

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté.

**ACTION DES GLYCOSIDES CARDIOTONIQUES
SUR LES TRANSFERTS
DES IONS POTASSIUM ET SODIUM
AU NIVEAU DU CŒUR**

VU ET APPROUVÉ :

Paris, le 10 janvier 1962.

Le Doyen
de la Faculté des Sciences,
M. ZAMANSKY.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Le Recteur
de l'Académie de Paris,

JEAN ROCHE.

Printed in France.